

Aus dem Institut für Rechtsmedizin (Direktor: Professor Dr. med. Dr. jur. Kaatsch)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel an der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel

MITOCHONDRIALE MUTAGENESE IM BLUT VON HOCHBETAGTEN

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

CAROLIN DRENSKE

aus Pinneberg

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. N. von Wurmb-Schwark

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. A. Nebel

Tag der mündlichen
Prüfung: 08.12.2009

Zum Druck genehmigt,
Kiel, den 27.10.2009

gez. Carolin Drenske

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Mitochondrien	1
1.1.1 Das mitochondriale Genom	2
1.1.2 Theorie der freien Radikale	3
1.1.3 Deletionen der Mitochondrien.....	4
1.2 Blut.....	7
1.2.1 Das Blut und seine Bestandteile.....	7
1.2.2 Blut, mtDNA und die 4977 bp Deletion	8
1.3 Zielsetzung.....	9
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Probenmaterial.....	10
2.2 DNA-Aufarbeitung.....	11
2.2.1 DNA-Extraktion aus Blut.....	11
2.2.2 DNA-Quantifizierung mittels Photometrie	11
2.2.3 Überprüfung von DNA-Qualität und -Quantität mittels Agarose- Gelelektrophorese	12
2.3 Nachweis und relative Quantifizierung der spezifischen mitochondrialen Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	13
2.3.1 Duplex-PCR	14
2.3.2 Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese	16
2.4 Qualitätssicherung durch Positiv- und Negativkontrollen	17
2.5 Statistische Auswertung.....	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit der relativen Quantifikation mittels Duplex-PCR	20
3.2 Auswahl der Daten.....	21
3.2.1 Methode 1	21
3.2.2 Methode 2	22
3.3 Vorkommen der 4977 bp mtDNA Deletion	23
3.4 Relative Quantifikation der 4977 bp mtDNA Deletion.....	24

3.5 Geschlechtsspezifität	26
4 Diskussion	28
4.1 Proben	28
4.1.1 Auswahl der Proben	28
4.1.2 Anzahl der Proben.....	28
4.2 Vorkommen der 4977 bp Deletion der mtDNA in Blutproben.....	31
4.2.1 Relative Quantifikation der dmtDNA.....	31
4.2.2 Vergleichbarkeit der Ergebnisse.....	31
4.3 Auswirkungen von Zellzahlunterschieden auf die 4977 bp Deletion im Blut ...	32
4.4 Menge der mtDNA und Langlebigkeit.....	33
4.4.1 Endogene Einflüsse.....	34
4.4.2 Exogene Einflüsse.....	34
5 Zusammenfassung.....	36
6 Anhang	37
6.1 Alphabetische Chemikalienliste	37
6.2 Ansatz von Gebrauchslösungen	38
6.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien	39
6.4 Abkürzungen.....	40
6.5 Tabellen	41
6.6 Rohdaten	42
7 Literatur	56
8 Danksagung	62
9 Lebenslauf.....	63

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

Alle nicht photosynthetisch aktiven, aerob lebenden Zellen sind abhängig von der oxidativen Energiegewinnung (Alberts et al., 2002). Die vollständige Oxidation von Zuckern und Fetten mit molekularem Sauerstoff zu Kohlendioxid und Wasser und die Speicherung der so gewonnenen Energie in Form von energiereichen Phosphatverbindungen findet in den Mitochondrien statt. Dieser oxidative Phosphorylierung genannte Vorgang liefert unter physiologischen Bedingungen mehr als 80 % des Energiebedarfs eines Erwachsenen (Papa et al., 1996).

Die Zahl der Mitochondrien ist in verschiedenen Geweben abhängig vom Energiebedarf dieser Gewebe und variiert zwischen hundert bis mehr als tausend Mitochondrien pro Zelle (Wei et al., 1998). So haben etwa Neurone oder Hepatozyten eine hohe Mitochondriendichte, ebenso wie Drüsenzellen, Nierenepithelien, Skelett- und Herzmuskelzellen. Zellen des thymolymphatischen Systems und Leukozyten hingegen sind verhältnismäßig arm an Mitochondrien (Schmidt, Thews et al. 2000).

Mitochondrien sind etwa 4 µm lange Organellen mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1 µm (Müller-Höcker et al., 1994; Alberts et al., 2002) und sind im Zytosol aller eukaryotischen Zellen vorhanden. Sie bestehen aus zwei Membransystemen (Berg et al. 2003), die sie in zwei Kompartimente unterteilen. Die äußere ionenpermeable Membran trennt das Mitochondrium vom Zytosol (Löffler et al., 2003). Die innere Membran ist für nahezu alle Ionen und Moleküle undurchlässig und stark in so genannte Cristae gefaltet (Berg et al. 2003). In ihr sind die Enzyme der Atmungskette integriert. In dem von der inneren Mitochondrienmembran umgebenen Matrixraum findet die Endoxidation der Nahrungsstoffe statt (Löffler et al., 2003).

Die Atmungskette besteht aus insgesamt fünf Enzymkomplexen, die aus jeweils mehreren Untereinheiten aufgebaut sind. In der Atmungskette werden Protonen und Elektronen der Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ aus dem Citratzyklus auf O₂ zur Bildung von H₂O übertragen. Dabei reichern sich Protonen (H⁺) auf der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran an. Dieser elektrochemische Gradient stellt die treibende Kraft für die ATP-Synthese dar (Müller-Höcker et al., 1994).

1.1.1 Das mitochondriale Genom

Die nahezu ausschließlich maternal vererbten Mitochondrien (Taanman et al., 1999) enthalten ein eigenes Genom (mtDNA). Die Existenz dieses extrachromosomalen genetischen Systems ermöglicht den Mitochondrien, semiautonom Proteine zu synthetisieren (Wei et al., 1998). Jedes Mitochondrium enthält zwei bis zehn Kopien des mitochondrialen Genoms (Wei et al., 1998; Löffler et al., 2003), wobei die humane mtDNA aus zwei komplementären Ringen besteht und lediglich 16.569 Basenpaare enthält (Taanman et al., 1999). Die mtDNA ist Träger der Erbinformation für 13 von 60 Polypeptiden der Atmungskette (Gadaleta et al., 1998) sowie zwei rRNAs und 22 tRNAs (Wei et al., 1998). Bei den Polypeptiden handelt es sich um sieben Untereinheiten des Komplexes I (NADH Dehydrogenase), eine Untereinheit des Komplexes III (Cytochrom Reduktase), drei Untereinheiten des Komplexes IV (Cytochrom Oxidase) und zwei Untereinheiten des Komplexes V (F_0F_1 -ATP-Synthase) der Atmungskette. Komplex II (Succinat Dehydrogenase) der Atmungskette enthält nur von nukleärer DNA (nDNA) kodierte Untereinheiten. Alle anderen Komplexe bestehen sowohl aus mtDNA und nDNA kodierten Untereinheiten (Schon et al., 1997).

Die mtDNA wird in einen purinnukleotidreichen H-Strang (heavy, schwerer Strang), und einen pyrimidinreichen L-Strang (light, leichter Strang) unterteilt. Beide weisen einen eigenen Replikationsursprung, Ori-H und Ori-L, auf. Der L-Strang kodiert lediglich für ein Strukturprotein (eine Untereinheit des Komplex I) sowie acht tRNAs. Alle übrigen mitochondrialen Gene befinden sich auf dem H-Strang (Müller-Höcker et al., 1994). Humane mtDNA enthält, mit Ausnahme des D-Loops, keine Introns. Fast jedes Nukleotid ist somit Teil einer kodierenden Sequenz (Anderson et al., 1981). Die D-(displacement) Loop-Region speichert die genetische Information für die Transkription und Replikation des Genoms. Hier ist außerdem der Startbereich für die Replikation des H-Strangs lokalisiert (Müller-Höcker et al., 1994).

Weiterhin weisen Mitochondrien nur 22 tRNA-Moleküle auf, während das nukleäre Genom mindestens 32 tRNAs für die Translation benötigt (Müller-Höcker et al., 1994; Alberts et al., 2002).

1.1.2 Theorie der freien Radikale

Die Theorie der freien Radikale wurde erstmalig in den 50er Jahren von der Arbeitsgruppe von Harman in Betracht gezogen (Harman et al., 1956).

Reactive oxygen species (ROS) und freie Radikale entstehen als Nebenprodukte unter physiologischen Bedingungen während des Transfers von Elektronen von NADH oder FADH₂ auf molekularen Sauerstoff während der Atmungskette (Wei et al., 1998).

Da die Mitochondrien sowohl die intrazelluläre Hauptquelle als auch Hauptziel der ROS und der freien Radikale darstellen (Wei et al., 1998; Lee et al., 2000; Lenaz et al., 2002), ist die mtDNA kontinuierlich einem hohen Level an ROS und freien Radikalen ausgesetzt und zudem noch aufgrund des fehlenden Schutzes durch Histone und weniger effiziente Reparaturmechanismen etwa 10 bis 20 mal empfindlicher gegenüber Mutationen und oxidativem Stress als die nukleäre DNA (nDNA) (Wei et al., 1998).

Normalerweise werden die toxischen Abfallprodukte in den Mitochondrien von Antioxidantien und antioxidativen Enzymen wie z.B. Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase beseitigt (Wei et al., 1998). Doch obwohl die menschliche Zelle diese verschiedenen enzymatischen und nicht-enzymatischen Mechanismen entwickelt hat um mit den während der Atmungskette anfallenden ROS und freien Radikalen umzugehen, kann ein Teil von ihnen den zellulären Abwehrmechanismen entgehen und vorübergehende oder permanente Schäden an zellulären Strukturen wie z.B. Nukleinsäuren, Lipiden und Membranen verursachen (Wei et al., 1998).

Defekte der Atmungskette wiederum führen abermals zu einer vermehrten Produktion von ROS und freien Radikalen in Mitochondrien und somit zu einem „circulus vitiosus“ (Lee et al., 2000). Dieser „Teufelskreis“ läuft in unterschiedlicher Intensität in den Zellen verschiedener Gewebe ab und führt somit zu einer unterschiedlichen Akkumulationsrate von oxidativ modifizierter und mutierter mtDNA (Wei et al., 1998) (Abb. 1).

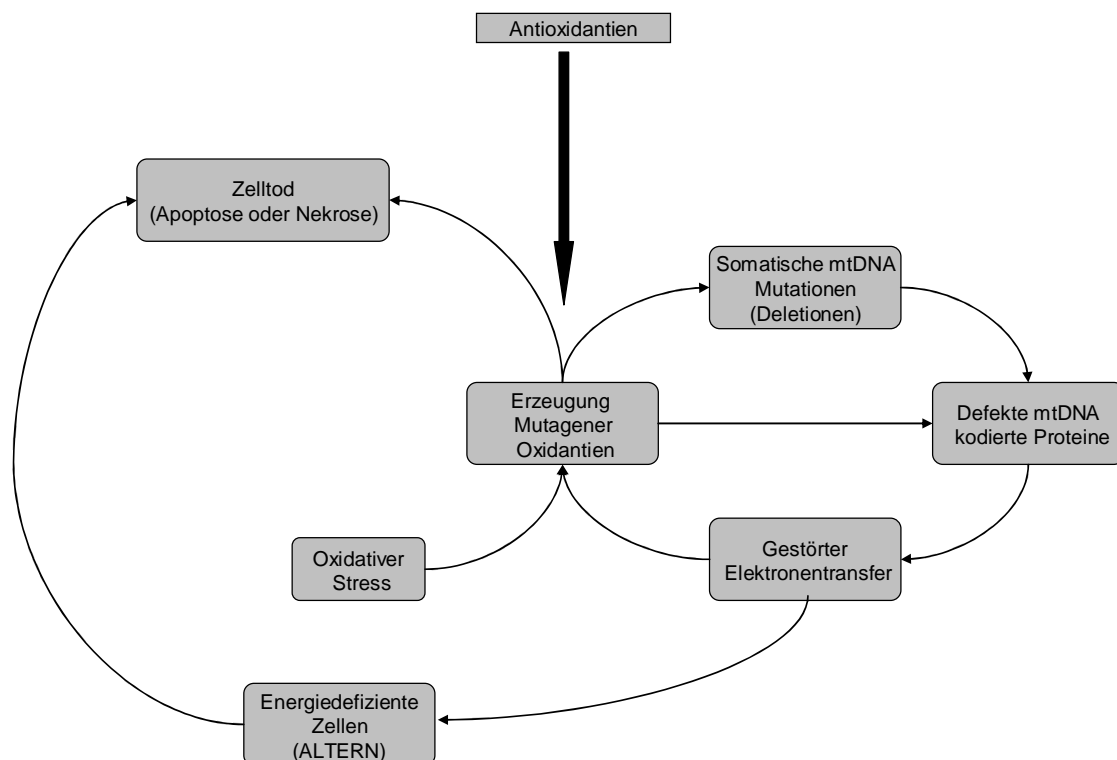


Abb. 1: Teufelskreis des oxidativen Stresses und mtDNA-Mutationen während Zelltod und dem Alterungsprozess (modifiziert nach Lenaz, 1998).

1.1.3 Deletionen der Mitochondrien

1.1.3.1 Deletionsentstehung

Die menschliche mtDNA weist, wie bereits erwähnt, im Gegensatz zum nukleären Genom weder Schutz durch Histone oder andere DNA-bindende Proteine auf, noch sind die DNA-Reparaturmechanismen gleichwertig. Dadurch ist sie wesentlich anfälliger für Deletionen (Löffler et al., 2003). Weitere Faktoren, die die Entstehung von Deletionen begünstigen sind zum einen die Tatsache, dass das mitochondriale Genom nahezu keine Introns besitzt, was dazu führt, dass sich Veränderungen der mtDNA wesentlich schneller auswirken als Störungen der nDNA (Linnane et al., 1992). Zum anderen hat die mtDNA zumindest vorübergehend Kontakt mit der inneren Mitochondrienmembran und ist dadurch extrem stark ROS und freien Radikalen, die während der Atmungskette entstehen, ausgesetzt (Wei et al., 1998).

Es scheint zudem so zu sein, dass sich deletierte mtDNA-Moleküle wesentlich schneller replizieren als unbeschädigte (Reichmann et al., 1996).

Neben stochastischen Schädigungen der mtDNA können ROS auch zu spezifischen Deletionen führen. In praktisch allen Fällen liegen sowohl mutierte als auch intakte DNA-Moleküle vor. Diesen Zustand der Koexistenz von zwei mtDNA-Arten in derselben Zelle nennt man Heteroplasmie (Wei et al., 1998).

1.1.3.2 Die 4977 bp Deletion

Es gibt viele verschiedene Deletionen, die in unterschiedlicher Häufigkeit auftreten. Die am häufigsten beobachtete mtDNA-Deletion ist die 4977 bp umfassende so genannte „common deletion“ (Müller-Höcker et al., 1994).

Die 4977 bp Deletion führt zu einem Verlust der Gene oder Teile der Gene der mtDNA, die für ATPase 8 und 6 (Komplex V), COXIII (Komplex IV), ND3, ND4, ND4L und ND5 (Komplex I) kodieren (Mohamed et al., 2004).

Die 4977 bp Deletion ist dabei von zwei 13 bp umfassenden direct repeats [ACCTCCCTCACCA] umgeben (Cortopassi et al., 1990; Linnane et al., 1992). Diese so genannten „hot spots“ im Bereich der Nukleotidpositionen 8.470 und 13.447 des mitochondrialen Genoms könnten verantwortlich sein für den spezifischen Verlust der 4977 bp langen Sequenz (Mita et al., 1990).

In Probenmaterial gesunder Probanden konnte die 4977 bp Deletion unter anderem in postmitotischem Gewebe wie z.B. in verschiedenen zentralnervösen Strukturen (Cortopassi et al., 1990), im Skelettmuskel (Hsieh et al., 1994), Zwerchfell, Herzmuskel (Cortopassi et al., 1992), als auch in sich schnell replizierenden Geweben wie der Haut (Birch-Machin et al., 1998), im Knochen (Varanasi et al., 2001), und im Blut (von Wurmb et al., 1998; Meissner et al., 2000) nachgewiesen werden.

1.1.3.3. Altersabhängigkeit mitochondrialer Deletionen

Bei bestimmten Krankheiten, wie z.B. LHON (Leber's Hereditary Optic Neuropathy), MERRF (Myoclonus Epilepsy with Ragged- Red Fibers) und MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke- like Episodes) wurde eine Zunahme an mitochondrialen Deletionen festgestellt (Schon et al., 1997), doch auch bei gesunden Menschen nimmt die Anzahl der Defekte der mtDNA im Laufe des Lebens in verschiedenen Geweben zu (Löffler et al., 2003).

Es gibt Belege dafür, dass sich die mitochondriale Funktion und bioenergetische Kapazität während des normalen Alterns verschlechtert (Mohamed et al., 2004; Lee und Wei 2000), was sich auch darin ausdrückt, dass mit zunehmendem Alter ein progressiver Abfall des ADP- zu ATP-Verhältnisses zu verzeichnen ist (Löffler et al., 2003).

Die Theorie der Freien Radikale besagt, dass das menschliche Altern durch eine Anhäufung von oxidativem Schaden in verschiedenen Biomolekülen durch freie Radikale verursacht wird (Wei et al., 1998). Da die Aktivität und/oder die Quantität einiger antioxidativer Enzyme mit dem Alter abnimmt, kommt es zum Anstieg von ROS und freien Radikalen und somit wird der oxidative Stress in den Mitochondrien während des Alterungsprozesses erhöht (Wei et al., 1998). Es ist belegt, dass somatische Mutationen der mtDNA mit dem Alter in verschiedenen Geweben verschiedener Spezies -Menschen eingeschlossen- akkumulieren (Ozawa et al., 1995). Besonders Gewebe mit geringer Mitoserate und hohem Sauerstoffbedarf, wie z.B. Gehirn, Herz- und Skelettmuskel zeigen einen altersabhängigen Anstieg vieler Deletionen. Obwohl die Zahl der Deletionen in diesen Geweben hoch erscheint, liegen sie physiologisch noch stark unter dem Level, das als kritisch angesehen wird. Bei mindestens fünf verschiedenen Arten von mtDNA-Mutationen wurde eine Altersabhängigkeit belegt. Hierzu gehören: spezifische Large-scale-Deletionen – wie die 4977 bp Deletion-, Punktmutationen, Insertionen und kurze Tandem-Duplikationen in der D-Loop Region (Wei et al., 1998).

Es wurde lange Zeit diskutiert ob Deletionen der mtDNA altersabhängige Krankheiten und Langlebigkeit direkt beeinflussen. Studien an Mäusen belegen den Verdacht, dass der graduelle Funktionsrückgang der den Alterungsprozess charakterisiert durch eine progressive Anhäufung von mtDNA-Mutationen entsteht (Trifunovic et al., 2004; Kujoth et al., 2006).

Obwohl die 4977 bp Deletion der mtDNA nur für einen kleinen Teil des gesamten genetischen Schadens während des normalen Alterns in Betracht gezogen werden kann, repräsentiert sie jedoch „die Spitze des Mutations-Eisbergs“ (Cortopassi et al., 1992) und eignet sich damit als Markermolekül für zelluläre Schädigungen.

1.2 Blut

1.2.1 Das Blut und seine Bestandteile

Das Blut ist eine Suspension von Zellen in einer proteinhaltigen Elektrolytlösung und dient als Transportmittel für Gase, Wirkstoffe, Nähr- und Abfallstoffe.

Die zellulären Bestandteile des Blutes machen 44-46 % aus. Zu ihnen gehören die Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Die Bildung der Blutzellen findet im Knochenmark statt. Am Beginn der Entwicklung steht die pluripotente hämatopoietische Stammzelle, die sich unter dem Einfluss hormonähnlicher Wachstumsfaktoren zu den verschiedenen Zellen des Blutes ausdifferenzieren kann (siehe Abb. 2). Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Autoreproduktion) kann der Bestand an Stammzellen immer aufrechterhalten werden.

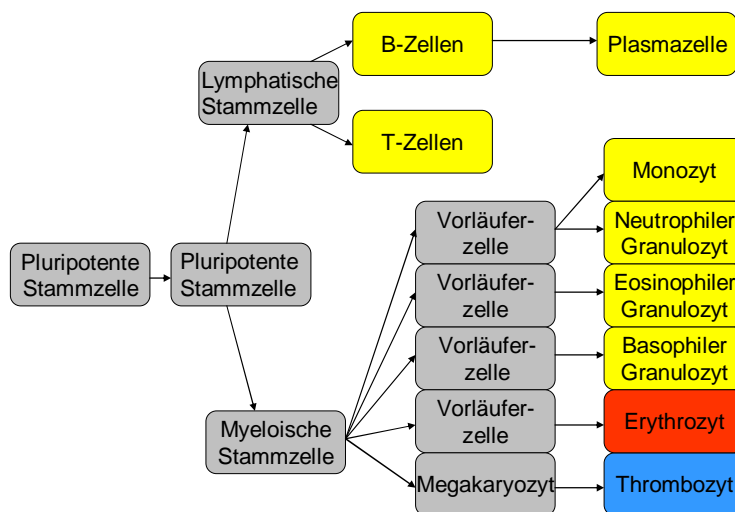


Abb. 2: Stammbaumschema der Hämatopoiese (vereinfacht übernommen aus Schmidt et al., 2000).

Die Aufgabe der Blutzellen ist vielfältig. Die Erythrozyten sind kernlose bikonkave Scheibchen mit einem mittleren Durchmesser von 7,5 µm. Sie stellen mit ca. 5 mio/µl Blut den größten Anteil der zellulären Bestandteile des Blutes und sind für den Gastransport verantwortlich. Ihre Lebensdauer beträgt 100-120 Tage. Einen weiteren großen Anteil der Blutzellen machen die Leukozyten mit ca. 5000/µl Blut aus. Im Gegensatz zur relativ konstanten Erythrozytenzahl kann die Anzahl der Leukozyten stark variieren, ohne dass dies einen Krankheitswert hat. Die Leukozyten werden in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten unterteilt. Die Lymphozyten (30 % der

Leukozyten), die sich wiederum in B- und T-Lymphozyten, sowie natürliche Killerzellen unterteilen lassen, vermitteln die Immunabwehr und machen 25-40 % der Blutleukozyten aus. Der Anteil der Granulozyten beträgt 64 % der Gesamtleukozyten. Hierbei wird unterschieden zwischen Neutrophilen Granulozyten (60 %), Eosinophilen Granulozyten (3 %) und Basophilen Granulozyten (<1 %). Die phagozytierenden und mit vielen lysosomalen Enzymen ausgestatteten Neutrophilen sind die wichtigsten Zellen des unspezifischen Abwehrsystems. Die Zahl der Eosinophilen ist u.a. bei allergischen Reaktionen und Parasitenbefall erhöht. Die Basophilen enthalten Heparin und Histamin, sie tragen Antikörper und spielen eine Rolle beim Zustandekommen allergischer Reaktionen. Weitere 6 % der Leukozyten werden durch die Monozyten gestellt. Sie verbleiben nur 2-3 Tage im Blut, um dann ins Gewebe auszuwandern und Ihre Aufgabe als Gewebsmakrophagen zu übernehmen.

Die dritte Hauptgruppe der Blutzellen bilden die Thrombozyten. Sie entstehen als Abschnürungen des Zytoplasmas von mehrkernigen Vorläuferzellen, den Megakaryozyten. Ihre Anzahl beträgt ca. 300.000/ μ l Blut und ihre Verweildauer im Blut beträgt 5-11 Tage. Die Aufgabe der Thrombozyten ist es, nach Aktivierung durch verschiedene Faktoren zu aggregieren und zu einer Blutstillung zu führen (Schmidt et al., 2000)

Allen Zellen des Blutes mit Ausnahme der reifen Erythrozyten besitzen Mitochondrien und können somit mtDNA enthalten (Schmidt et al., 2000).

1.2.2 Blut, mtDNA und die 4977 bp Deletion

Die 4977 bp Deletion kann auch –wie bereits erwähnt-, wenn auch in wesentlich geringerer Ausprägung, in sich schnell replizierenden Geweben wie z.B. Blut nachgewiesen werden (Gattermann et al., 1995; von Wurmb et al., 1998).

In den späten 70er Jahren haben Pikó et al. eine Serie von Studien über den strukturellen Umbau von mtDNA in Leukozyten alter Menschen und in gealterten Mäusen und Ratten durchgeführt. Sie entdeckten erstmalig den Anstieg der Frequenz reorganisierter mtDNA Moleküle in gealterten Tieren (Wei et al., 1998).

Gatterman et al. waren die ersten, die von einer erfolgreichen Detektion der 4977 bp Deletion im menschlichen Blut berichtet haben (Gattermann et al., 1995).

Verbesserungen der PCR-Bedingungen ermöglichten später auch die Detektion von mtDNA im Blut gesunder junger und gealterter Probanden (von Wurmb et al., 1998).

1.3 Zielsetzung

Die 4977 bp Deletion konnte unter anderem in postmitotischem Gewebe wie z.B. in verschiedenen zentralnervösen Strukturen (Cortopassi et al., 1990), im Skelettmuskel (Hsieh et al., 1994), Zwerchfell, Herzmuskel (Cortopassi et al., 1992), sowie auch in sich schnell replizierenden Geweben wie der Haut (Birch-Machin et al., 1998; Berneburg et al., 2004), im Knochen (Varanasi et al., 2001), und im Blut (von Wurmb et al., 1998; Meissner et al., 2000) nachgewiesen werden. Eine direkte altersabhängige Akkumulation dieser Deletion wurde jedoch erst in ausdifferenzierten Geweben wie Skelettmuskulatur und Nervengewebe belegt (Reiter et al., 1995; Meissner et al., 1999; Cottrell et al., 2001; Bua et al., 2006; Herbst et al., 2007).

Im Blut wurde eine Altersabhängigkeit der Akkumulation von 4977 bp deletierter DNA schon mehrfach diskutiert (Gattermann et al., 1995; Meissner et al., 2000; Mohamed et al., 2004; Jelkmann, 2008) konnte jedoch bisher nicht sicher nachgewiesen werden. Dies könnte zum einen dadurch zu erklären sein, dass die 4977 bp Deletion im Blut tatsächlich nicht altersabhängig akkumuliert, jedoch auch durch die geringe Anzahl der Proben und dadurch bedingte Fehler erklärt werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, an einem bisher in diesem Ausmaß noch nicht untersuchtem Probandenkollektiv mit sowohl 100 unter 12-jährigen als auch 276 über 95-jährigen und einer großen Anzahl von Proben (652) eine mögliche Altersabhängigkeit der 4977 bp Deletion im Blut nachzuweisen oder durch verminderte Deletion im Alter einen genetischen Hinweis darauf zu finden warum die hochbetagten Menschen so alt werden. Durch die hohe Probenanzahl sollen der statistische Fehler minimiert und eine Aussage über eine Tendenz zur Akkumulation ermöglicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Probenmaterial

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde DNA aus Vollblut verwendet. Es wurden Blutproben von insgesamt 652 Personen ausgewählt, die sich in drei Gruppen unterteilen ließen: Junge (PJ), Personen mit hohem Lebensalter (PM) und Personen mit überdurchschnittlich hohem Lebensalter (PA). Des Weiteren wurden Testproben von 5 Labormitarbeitern zum Etablieren der Methodik eingesetzt.

Das Blut der Kinder (PJ) entstammt dem Routinefundus des Instituts für Rechtsmedizin des UKSH. Diese Blutproben wurden in den Jahren 2004-2005 für Abstammungsanalysen untersucht. Die Proben wurden derart anonymisiert, dass lediglich Geschlecht und Lebensalter bekannt bleiben. Ein Rückschluss auf die betroffenen Personen ist dem Untersucher nicht möglich.

Diese Proben waren bereits mit dem Nucleo Spin Blood Quick Pure Kit der Firma Macherey Nagel aufgearbeitet. Für die vorliegende Studie mussten sie photometrisch quantifiziert und auf 10 ng/µl verdünnt werden. Es wurden je 30 ng/Probe in die PCR eingesetzt.

Insgesamt wurden für die Gruppe PJ 100 Proben deutscher Kinder im Alter von 1- 12 Jahren (Durchschnittsalter: 3,2 Jahre), mit einem ausgeglichenen Geschlechterverhältnis (45 Mädchen und 55 Jungen) untersucht.

Zur Untersuchung der Gruppe PM und PA standen fertig extrahierte DNA-Proben zur Verfügung, die vom Institut für Medizinische Molekularbiologie des UKSH (unter Benutzung des FlexiGene Blood Kits, Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgearbeitet und lyophilisiert in 96er Multiplatten zur Verfügung gestellt wurden. Jede Probe enthielt 30 ng DNA, was durch fluorometrische Messung mit Picogreen (Molecular Probes, Oregon, USA) sichergestellt wurde.

Die Gruppe PM setzt sich aus 276 Personen zwischen dem 60. und 75. Lebensjahr (Durchschnittsalter: 67,7 Jahre) zusammen. Von der Gruppe PA mit ebenfalls 276 Personen und einer Altersspanne von 95 bis 109 Lebensjahren (Durchschnittsalter: 99,2 Jahre) wurde noch einmal eine Untergruppe abgespalten. Diese Untergruppe enthält 145 über Hundertjährige mit einem Durchschnittsalter von 101,4 Jahren. Das Geschlechterverhältnis beider Gruppen beträgt 75 % Frauen zu 25 % Männer.

Die Blutproben der fünf Mitarbeiter wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit wie im Folgenden beschrieben aufgearbeitet.

Als Kontrolle wurden definierte Mengen an Skelettmuskel-DNA einer 86-jährigen weiblichen Personen nach Obduktion eingesetzt, die unter Benutzung des Spin Tissue Kit (Invitex) aufgearbeitet wurden. Diese Gewebe sind im Rahmen der Routineanalysen entnommen worden. Auch hier erfolgte eine Anonymisierung.

2.2 DNA-Aufarbeitung

2.2.1 DNA-Extraktion aus Blut

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem Nucleo Spin Blood Quick Pure Kit der Firma Macherey Nagel. Hierzu werden 200 µl Blut in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 25 µl Proteinase K vermischt. Anschließend werden 200 µl BQ1 Puffer hinzugegeben, die Probe wird 15 sec gevortext. Es folgt eine Inkubation unter Schütteln bei 70 °C über 10 min, wobei es zu einer bräunlichen Verfärbung des Lysats kommt. Geschieht dies nach 10 min nicht, kann der Vorgang um weitere 10 min verlängert werden. Anschließend werden 200 µl Ethanol 95 % hinzugefügt und die Probe wird nochmals gevortext. Wenn diese auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird sie in ein neues Reaktionsröhrchen (sog. Columns) überführt und bei 13.000 rpm 1 min zentrifugiert. Nach dem Hinzufügen von 350 µl BQ2-Puffer folgt eine weitere 3 min dauernde Zentrifugation bei gleicher Geschwindigkeit. Die Columns werden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 50 µl Elutionsbuffer überschichtet. Auf eine weitere Minute Inkubation bei Raumtemperatur folgt eine letzte Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm, durch die die DNA aus dem im Röhrchen befindlichen Filter in das Reaktionsgefäß eluiert wird, wo sie nun gereinigt vorliegt.

2.2.2 DNA-Quantifizierung mittels Photometrie

Die extrahierten DNA-Proben werden zunächst photometrisch quantifiziert. Auf diese Weise wird auch die Reinheit der Lösung überprüft. Die photometrische Messung wird in einem Spektralphotometer (SmartSpec™ Plus, BioRad) mit einer Deuteriumlampe durchgeführt. Das Photometer misst die Extinktion der Probe bei 260 nm und gibt die daraus errechnete DNA-Konzentration in µg/ml an. Eine Extinktion von 1 entspricht einem Gehalt von 50 µl doppelsträngiger DNA/ml Lösung.

Aus dem Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm kann der Reinheitsgrad der DNA-Lösung bestimmt werden. Der Quotient sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Niedrigere Werte zeigen eine Proteinverunreinigung an, die sich negativ auf das PCR-Verfahren auswirken kann. Aus dem Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 230 nm kann die Lösungsmittelverunreinigung festgestellt werden. Dieser Wert sollte <1 sein. Die sichere Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 10 µg/ml. Für die Messung werden 100 µl der DNA-Probe mit 900 µl sterilem Aqua bidest versetzt und in einer Quarzküvette gegen einen Blindwert (reines Aqua bidest) gemessen. Das Photometer gibt direkt die DNA-Konzentration in µg/ml an.

2.2.3 Überprüfung von DNA-Qualität und -Quantität mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die isolierte DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert:

Nukleinsäuren sind negativ geladene Moleküle, die durch das Anlegen eines elektrischen Feldes durch eine Gelmatrix zur positiven Elektrode wandern. Die Größe der Matrixporen bestimmt hierbei die Laufgeschwindigkeit. Kleinere DNA-Moleküle kommen schneller voran, da sie seltener mit der Matrix kollidieren.

Zur Herstellung der Gelmatrix wird Agarose eingesetzt, welche im Wesentlichen aus hoch gereinigtem Agar, einem natürlich vorkommenden, langkettigen Polysaccharid besteht, das aus Seetang gewonnen wird.

Zur Herstellung eines 1 %igen Gels wird 1 g Agarose (SeaKem® ME Agarose, BMA) mit 1 x TBE Puffer auf 100 ml aufgefüllt und leicht geschwenkt, sodass sich die Agarose gleichmäßig verteilt. Das Gemisch wird in einer Mikrowelle für 2 min aufgeköcht. Anschließend werden der auf etwa 70 °C abgekühlten Lösung 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) beigemengt. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der bei Interkalation mit der DNA unter UV-Licht stark fluoresziert.

Mit den hier verwendeten Minigelen kann eine Mindestmenge hochmolekularer DNA von etwa 5 ng nachgewiesen werden. Das Gel wird in eine horizontale Minigelkammer (Roth) aus durchsichtigem Plexiglas gegossen. Um später Aussparungen, so genannte Slots, zu erhalten, werden „Kämme“ in das noch flüssige Gel gesteckt. Nach ca. 45 min ist das Gel auspolymerisiert und die „Kämme“ können entfernt werden. Anschließend wird das Gel mit 1 x TBE Laufpuffer vollständig bedeckt. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel, werden jeweils 5 µl

der DNA-Proben mit 5 µl Laufpuffer, der als Farbmaler niedermolekulares Bromphenolblau enthält, vermengt. Die DNA-Leiter enthält bereits Farbmaler. Anschließend werden der DNA Standard (H21, Boline) und die Proben mit einer Pipette in die Slots pipettiert und die Reihenfolge in einem Protokoll festgehalten. Die Elektrophorese wird mit 50 V gestartet und läuft für etwa 30 min.

Zur Auswertung der Banden unter UV-Licht sowie zur Fotodokumentation des Gels wird der Gel-Doc EQ von Bio-Rad verwendet. Anschließend wird das Gel mit einer Digitalkamera fotografiert.

2.3 Nachweis und relative Quantifizierung der spezifischen mitochondrialen Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

1985 entwickelte Kary Mullis die PCR-Methode, mit der einzelne DNA-Abschnitte selbst aus sehr geringen DNA-Mengen hochspezifisch vermehrt werden können. Hierzu wird zunächst eine Probe benötigt, die geringe Mengen der zu vermehrenden DNA (Template) enthalten muss. Außerdem erfordert die Amplifikation geeignete Pufferbedingungen, $MgCl_2$, die vier Desoxyribonukleotidtriphosphate der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin, Oligonukleotid-Primer sowie eine DNA-Polymerase. Zusätzlich können noch PCR-Beschleuniger, wie z.B. DMSO, zum Einsatz kommen. Die Primer weisen eine definierte Basenabfolge auf, durch die sie unter geeigneten Versuchsbedingungen nur an die Endsequenzen des zu vermehrenden Gens binden und so für die charakteristische Reaktion sorgen. Die DNA-Polymerase synthetisiert, von den Primern ausgehend, die entsprechenden Nukleotidabfolgen.

Für eine Vervielfältigung der DNA muss die Versuchstemperatur ständig gewechselt werden. Damit die Primer binden können, wird zuerst die Template-DNA durch Erhitzen in ihre Einzelstränge gespalten (Denaturierung). Danach wird die Temperatur gesenkt. Unter diesen Bedingungen können die Primer spezifisch an die einzelsträngige Template-DNA binden (Annealing). Als DNA-Polymerase werden heute nur noch hitzestabile Enzyme verwendet, die bei einer Temperatur von 72 °C die Nukleotidbausteine unter Abspaltung von Pyrophosphat zu DNA-Molekülen verknüpfen (Extension). Anschließend werden die neu synthetisierten DNA-Stränge wieder denaturiert und ein neuer Zyklus kann beginnen. Die speziellen in dieser Arbeit angewendeten PCR-Bedingungen sind im Anhang in Tabelle 4 aufgeführt.

2.3.1 Duplex-PCR

Statt nur eines Primerpaares, mit dem nur ein spezifisches Fragment synthetisiert wird (Singleplex-PCR), können -wie in dieser Arbeit- auch zwei Primerpaare gleichzeitig eingesetzt werden, sodass zwei unterschiedliche Fragmente in nur einer PCR entstehen (Duplex-PCR).

Es wurden in einem PCR-Ansatz zwei verschiedene Fragmente der humanen mitochondrialen DNA in einem Reaktionsansatz amplifiziert:

260 bp Fragment der gesamt DNA:

- L15: np 3305-3328; 5'-AAC ATA CCC ATG GCC AAC CTC CTA C-3'
- H16: np 3563-3539; 5'-CAT AGT AGA AGA GCG ATG GTG AGA G-3'

sowie ein 238 bp Fragment der 4977 bp dmtDNA, welches nur amplifiziert werden kann, wenn die spezifische 4977 bp Deletion vorliegt (Abb. 3), weil nur dann die Primer nahe genug beieinander liegen, um ein definiertes DNA-Fragment zu amplifizieren („short cycle PCR“)

- L35: np 8285-8309; 5'-CTC TAG AGC CCA CTG TAA AGC TAA C-3'
- H45: np 13499-13475; 5'-CCT GTG AGG AAA GGT ATT CCT GCT A-3'

(nach von Wurmb et al., 1998).

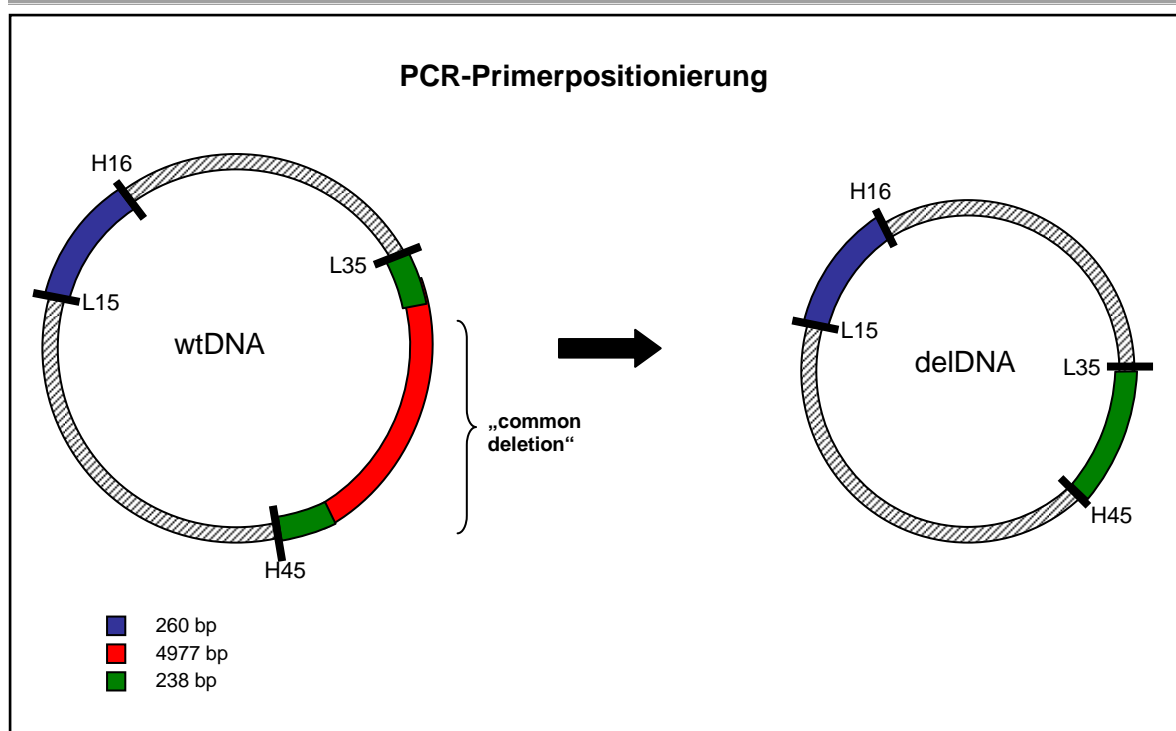


Abb. 3: Schematische Darstellung der PCR Primerpositionierung zur Detektion des deletierten Moleküls (frei übernommen und erweitert nach Gattermann et al., 1995)

Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert und durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) gereinigt. Das Lyophilisat wird in 1 x TE Puffer gelöst, so dass die Endkonzentration 100 mM beträgt. Die Primer werden als Primermix (10 µl je Primer) in Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch werden sie aufgetaut, mit sterilem Aqua bidest auf 10 mM verdünnt und in die PCR eingesetzt. Durch das Ansetzen solcher Primermixe wird gewährleistet, dass die in die PCR eingesetzten Primer nicht zu häufig aufgetaut bzw. eingefroren werden, denn diese Vorgänge können die Primer zerstören. Außerdem wird hierdurch das Kontaminationsrisiko gesenkt. Auch die übrigen Reagenzien werden, soweit möglich, portionsweise aufbewahrt. Hierzu gehören die Immobilase, der Puffer, die dNTPs, die als Mix aller vier Nukleotide angesetzt werden, sowie Magnesium, DMSO und das benötigte Aqua bidest.

Bei den Proben der Gruppe PJ wurden jeweils 5 µl DNA mit 7,5 µl Reaktionslösung angesetzt, wie in Tabelle 5 angegeben, so dass ein Reaktionsvolumen von 12,5 µl/Probe entsteht.

Die Analyse der Proben der Gruppe PM und PA geschah in so genannten Multiplatten, in denen die nötige DNA Menge in lyophilisierter Form vorlag.

Entsprechend musste der Reaktionsansatz auf 12,5 µl angepasst werden (siehe Tabelle 6).

Das Temperaturprofil findet sich im Anhang in Tabelle 4.

2.3.2 Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese

Die Fragmentanalyse bietet die Möglichkeit der automatisierten exakten Größenbestimmung und Quantifizierung der in den zu untersuchenden Proben enthaltenen DNA-Fragmente. Die Amplifizierung der spezifischen Fragmente wird als Duplex-PCR durchgeführt. Um die Proben für den Laser des Gerätes erkennbar zu machen, werden die für die PCR benötigten Vorwärts-Primer FAM5-markiert (L15* und L35*).

Es wird ein Mastermix bestehend aus Formamid und ROX 500 (Applied Biosystems) als Größenstandard angesetzt. Der Standard enthält neun verschiedene Fragmente von 50 bp bis 500 bp Größe. Je Probe werden 11,8 µl Formamid und 0,2 µl Größenstandard benötigt. Es werden je 12 µl des Mastermixes in 0,5 ml Genetic Analyzer Sample Tubes (Applied Biosystems) pipettiert. 1 µl, der in der Duplex-PCR amplifizierten Proben wird hinzugefügt und die Röhrchen mit Gummisepta verschlossen.

Die Proben werden dann in den ABI Prism® 310 Genetic Analyzer von Perkin Elmer eingesetzt und das Gerät dem Handbuch entsprechend (ABI Prism® 310 Genetic Analyzer User's Manual, 1997) gestartet.

Durch das Starten der Elektrophorese mit 15.000 Volt entsteht ein elektrisches Feld, und die DNA-Fragmente wandern durch ein gelartiges Polymer in der Kapillare von der Kathode zur Anode. Dabei werden die DNA-Fragmente der Länge nach aufgetrennt. Wenn die Fragmente am Fenster der Kapillare vorbeiwandern, werden die Farbstoffmoleküle durch einen Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt. Die Fluoreszenz wird mit einem optischen System auf einen Detektor mit CCD-Kamera gebracht und dort nach Wellenlänge und Signalstärke in digitale Messwerte umgewandelt.

Mit Hilfe der GeneScan® Analysis Software Version 3.1.2 (Applied Systems) werden die Werte mit bekannten Fragmentlängen des internen Standards verglichen und dann nach Farbmarkierung und Fragmentlänge zugeordnet. Dabei werden die unterschiedlichen Fragmente und ihre relativen Quantitäten graphisch als Kurven dargestellt, wobei eine Kurve einem Fragment entspricht (siehe Abb. 5) Zur

genaueren Quantifizierung gibt der Computer die Scheitelhöhe der Kurve sowie die Fläche unter der Kurve an

Die Analyse einer Probe dauert etwa 25 min; das Gerät kann mit 48 Proben beladen werden.

2.4 Qualitätssicherung durch Positiv- und Negativkontrollen

Um die Vergleichbarkeit der Proben sicher zu stellen, wurden mit jedem Mastermix (MM) fünf Positivkontrollen (K1- K5) angesetzt.

Tabelle 1: Bestückung der Positivkontrollen K1- K5

	K1	K2	K3	K4	K5
SM 1:1000	30ng:5µl				
SM 1:10000		3ng:5µl			
10⁷ wt -Mol			1µl	1µl	1µl
10⁴ del -Mol			1µl		
10³ del -Mol				1µl	
10² del -Mol					1µl
H₂O bidest			3µl	3µl	3µl
Mastermix	7,5µl	7,5µl	7,5µl	7,5µl	7,5µl

Probe K1 und K2 enthielten eine definierte Menge Skelettmuskel DNA (SM), während Positivkontrolle K3-K4 jeweils 1 mio Standardmolekülvorlagen (wt) und in abfallender Reihenfolge 1000 (K3), 100 (K4) und 10 (K5) Molekülmatritzen spezifisch für 4977 bp deletierte mtDNA (del) enthielten (Standard nach von Wurmb et al 2002). Die Daten der verschiedenen PCR-Läufe wurden nur in die Bewertung einbezogen, wenn die Positivkontrollen die gewünschten Ergebnisse zeigten (Abb. 5).

Um eventuelle Verunreinigungen aufzudecken wurde zusätzlich mit jedem Mastermix eine Negativkontrolle angesetzt.

Jede Probe wurde doppelt bestimmt und über die Standardamplifikation die Effizienz der verschiedenen PCR-Läufe überprüft. Es wurden nur Werte zur weiteren Analyse genutzt, wenn die Doppelbestimmungen reproduzierbar waren. Die Proben wurden zum Beispiel dann in die Auswertung mit einbezogen, wenn zwei Mal keine dmtDNA nachgewiesen werden konnte und die PCR-Effizienzen ähnlich waren oder wenn beim

ersten Lauf viel dmtDNA und bei der Doppelbestimmung etwas weniger dmtDNA, bei entsprechender PCR-Effizienz nachgewiesen werden konnte.

Um zusätzlich zu vermeiden, dass schlechtere Läufe sich vollständig auf eine der zwei Gruppen auswirken und so eine falsche Tendenz entsteht, wurden die Proben in den Multiplatten folgendermaßen aufgearbeitet. Jede 96er Platte wurde nach dem in Abbildung 4 gezeigten Schema durchnummeriert. Für jeden PCR-Lauf wurden die jeweils einander entsprechenden 24 Proben der drei unterschiedlichen Platten mit den fünf Kontrollproben in das PCR-Gerät eingesetzt. Durch diese Vorgehensweise wirken sich eventuelle Schwankungen auf alle drei Gruppen aus und machen sie somit wieder vergleichbar.

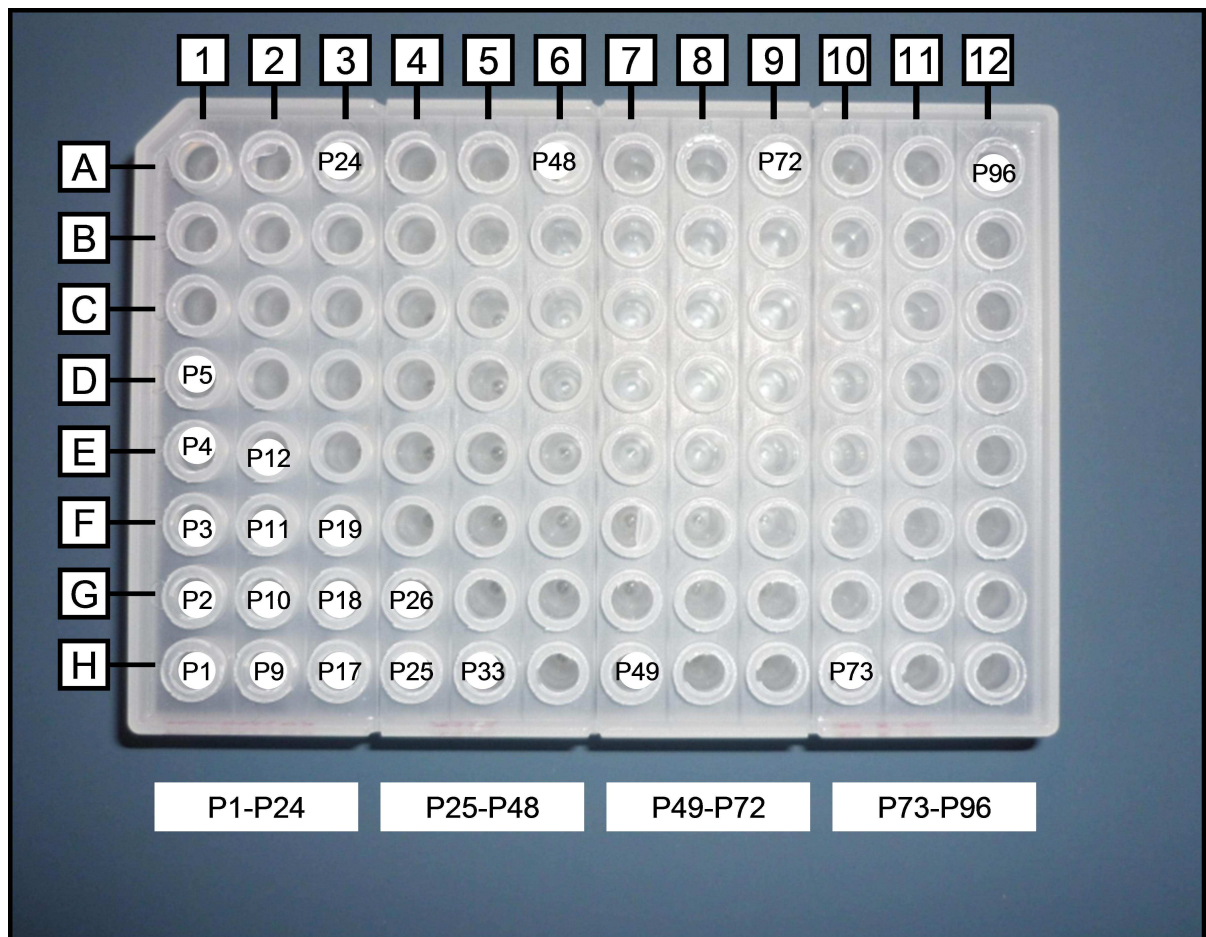


Abb. 4: Exemplarische Darstellung der Durchnummerierung der einzelnen Proben auf den 96er Multiplatten (P 1 - P 96)

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde von zwei Personen unabhängig voneinander durchgeführt. Alle Proben wurden doppelt bestimmt und Proben gingen nur als positiv in die Auswertung ein wenn der rfu zwischen 500 und 4000 relativen Höhenpeak lag.

Der Phi-Test (χ^2) nach Cramer für nicht-parametrische Daten wurde mit dem Web-Chi-Square-Kalkulator, verfügbar auf http://www.georgetown.edu/faculty/ballc/webtools/web_chi.html durchgeführt.

Der P-Wert wurde unter Benutzung des Graph Pad Quickcalcs, verfügbar unter <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm> abgeschätzt, wobei ein P-Wert von 0,05 oder weniger als statistisch relevant angesehen wurde.

Zusätzlich wurde der Mann-Whitney U-Test durchgeführt, um Unterschiede zwischen den drei Altersgruppen zu bestimmen.

3 Ergebnisse

3.1 Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit der relativen Quantifikation mittels Duplex-PCR

Um die Vergleichbarkeit der einzelnen PCRs untereinander zu überprüfen, wurden mit jedem Lauf Kontrollproben amplifiziert. Abbildung 5 zeigt das experimentelle Design und die Ergebnisse dieser Standardamplifikationen. Vor der Auswertung der Ergebnisse wurden die jeweils mitgelaufenen Kontrollproben überprüft, und es wurden nur die Daten für die endgültige Auswertung ausgewählt, deren mitgelaufene Standards das gewünschte Muster zeigten, beziehungsweise verschiedene PCR-Läufe zusammen ausgewertet, sofern die Standards vergleichbare PCR-Effizienzen aufwiesen.

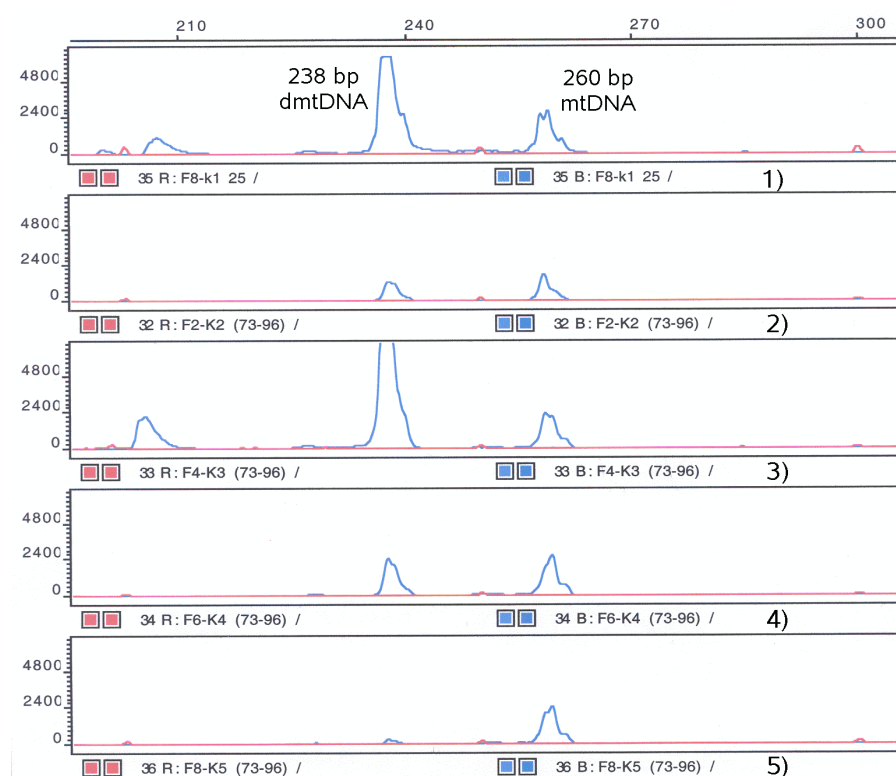


Abb. 5: Amplifikation von Standardproben zur relativen Quantifikation gesamter und 4977 bp deletierter mtDNA mittels ABI Prism® 310. Elektropherogramm.

1 und 2 Positivkontrollen (Skelettmuskel); deletionsspezifisches 238 bp großes und wildtypspezifisches 260 bp großes Fragment. 3 - 5: 1 mio Standardmolekülvorlagen (wt) und in abfallender Reihenfolge 1000 (3), 100 (4) und 10 (5) Molekülmatritzen spezifisch für 4977 bp deletierte mtDNA (del).

3.2 Auswahl der Daten

Jede Probe der einzelnen Gruppen wurde doppelt bestimmt.

Um nur die Proben in die Auswertung einzuschließen, bei denen mit Sicherheit eine Deletion nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden konnte, wurden die Daten nach zwei verschiedene Methoden bearbeitet und anschließend verglichen.

3.2.1 Methode 1

Die Methode 1 ist durch sehr enge Ein- und Ausschlusskriterien gekennzeichnet. Es wurden nur die Ergebnisse der Proben verwendet, die in beiden Proben der Doppelbestimmung eine Deletion bzw. keine Deletion aufwiesen. Aus diesen Daten wurde, bei gleicher PCR-Effizienz ein Mittelwert berechnet, oder der Datensatz ausgewählt, der den besseren Kontrollsatz aufwies. Nur diese Daten gingen dann in die weitere Auswertung ein.

Mit diesem Verfahren konnten jedoch nur 65 der 100 Proben der Gruppe PJ, 152 der 276 Proben der Gruppe PM und 133 der ebenfalls 276 Proben der Gruppe PA zur Auswertung herangezogen werden.

Da diese Methode nur einen geringen Anteil der Daten einschließt und somit eine große Anzahl der Proben aus der Auswertung ausgeschlossen würde, wird sie nur als Kontrolle für Methode 2 verwendet. Mit Methode 1 konnte die gleiche Tendenz wie mit Methode 2 nachgewiesen werden (Abb. 6 und Abb. 7) und somit wurden die Rohdaten der im weiteren Verlauf beschriebenen Ergebnisse mit Hilfe der Methode 2 ausgewählt.

Wertet man die Daten mit der Methode 1 aus, so findet sich in 3,08 % der Proben der Gruppe PJ die spezifische 4977 bp Deletion. In der Gruppe PM sind es 30,92 % und 26,06 % der Proben der Gruppe PA weisen dmtDNA⁴⁹⁷⁷ auf (Abb. 6).

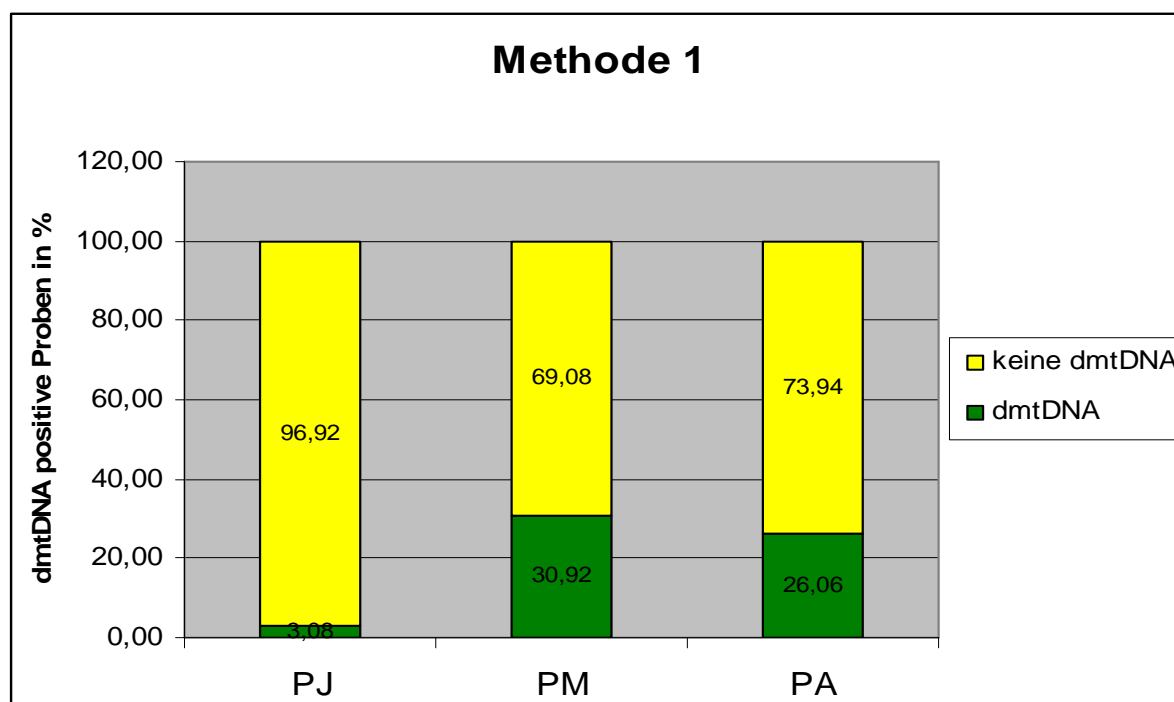


Abb. 6: Anwesenheit der 4977 bp mtDNA Deletion im Blut der Kinder (PJ), 60-75 Jährigen (PM) und der 95-107 Jährigen (PA).

3.2.2 Methode 2

Für die Methode 2 wurde ein sehr viel komplexeres Auswahlverfahren entwickelt. Eine wichtige Rolle hierbei spielte das Ergebnis der jeweils mitgelaufenen Kontrollen (siehe 3.1), die ein Maß für die Genauigkeit der Herstellung des Mastermixes, sowie die Funktion der einzelnen verwendeten Geräte darstellen.

Zum einen wurde bei den doppelt positiven bzw. negativen Ergebnissen wie in Methode 1 verfahren, außerdem wurden zudem die Werte zur weiteren Analyse genutzt, deren Doppelbestimmungen reproduzierbar waren. Die Proben wurden zum Beispiel dann in die Auswertung mit einbezogen, wenn zweimal keine dmtDNA nachgewiesen werden konnte und die PCR-Effizienzen ähnlich waren oder wenn beim ersten Lauf viel dmtDNA und bei der Doppelbestimmung etwas weniger dmtDNA, bei entsprechender PCR-Effizienz nachgewiesen werden konnte.

Mit der Methode 2 konnten wesentlich mehr Proben für die Auswertung herangezogen werden. In der Gruppe PJ konnten alle 100 Proben verwendet werden, bei der Gruppe PM 242 von 276 und 252 von 276 bei der Gruppe PA.

Die Auswertungen wurden dabei von zwei Personen unabhängig voneinander durchgeführt, um objektive Resultate zu erzielen.

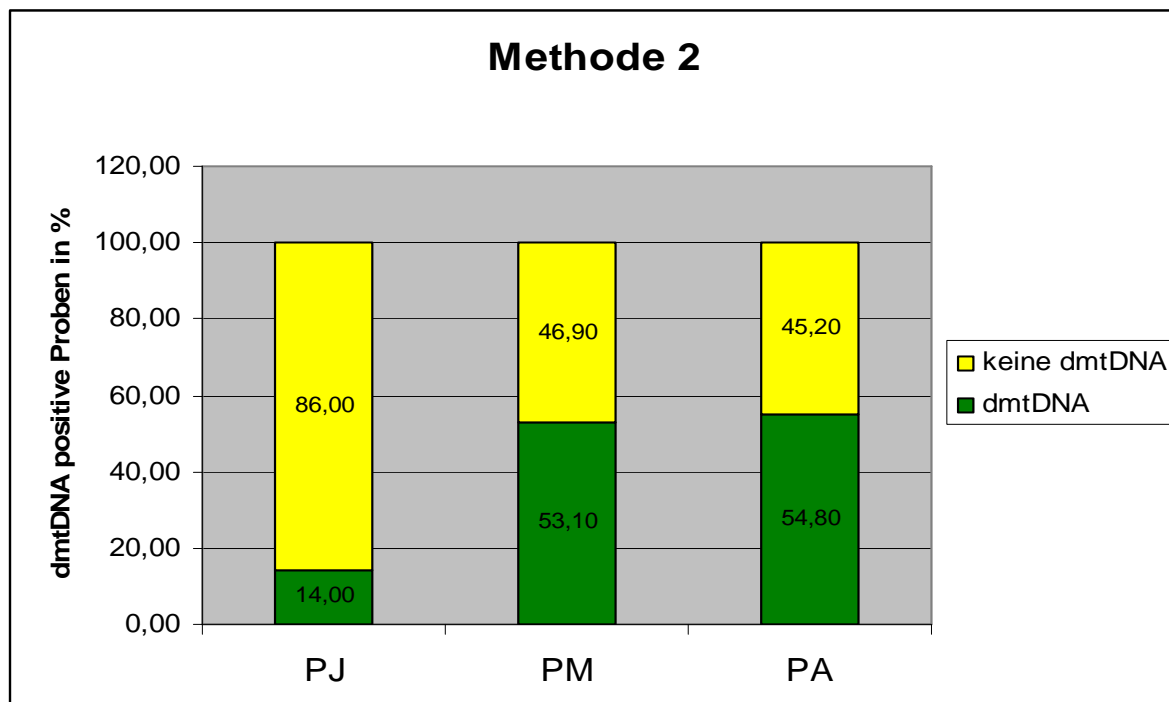


Abb. 7: Vorkommen der 4977 bp mtDNA Deletion im Blut der Kinder (PJ), 60-75 Jährigen (PM) und der 95-107 Jährigen (PA).

3.3 Vorkommen der 4977 bp mtDNA Deletion

Zur Amplifikation der gesamten mitochondrialen DNA der untersuchten Proben wurden jeweils 30 ng DNA eingesetzt. Die mtDNA Deletion wurde bei 14 % der Kinder (PJ), bei 53,1 % 60-75-Jährigen (PM), und bei 54,8 % der 95-107-Jährigen (PA) (Abb. 7) gefunden. Die Gruppe der Kinder unterschied sich dabei signifikant von beiden Erwachsenenengruppen ($p \leq 0.001$, $\chi^2 = 43.73$ für den PJ/PM Vergleich und $\chi^2 = 48,46$ für den PJ/PA Vergleich) während kein signifikanter Unterschied der Anwesenheit der 4977 bp mtDNA Deletion zwischen PM und PA ($p = 0.9$, $\chi^2 = 0.2$) gezeigt werden konnte. Mit der Methode 1 konnten ähnliche Ergebnisse nachgewiesen werden. Bei den Kindern (PJ) konnte in 3,08 % eine Deletion nachgewiesen werden, in den Gruppen PM und PA waren es 30,92 und 26,6 % (Abb. 6).

3.4 Relative Quantifikation der 4977 bp mtDNA Deletion

Die Analyse der relativen Menge an mtDNA⁴⁹⁷⁷ (ausgedrückt in rfu mtDNA⁴⁹⁷⁷ / rfu mtDNA) zeigt ein maximales Ratio von 0,78 (Mittelwert: 0,04) bei den jungen Individuen (PJ), während die maximalen Werte der 60-75-Jährigen (PM) bei 2,16 (Mittelwert: 0,29) und den 95-107-Jährigen (PA) bei 0,63 (Mittelwert: 0,1) lagen (Tab. 2). Die relative Quantität der mtDNA⁴⁹⁷⁷ der jungen (PJ) und erwachsenen (PM und PA) Individuen unterschieden sich höchst signifikant voneinander, ebenso die Werte der zwei Erwachsenengruppen PM und PA untereinander (Mann-Whitney U-Test: $p < 0,001$ in beiden Vergleichen).

Es konnte jedoch in keiner Altersgruppe eine altersabhängige Akkumulation der mtDNA⁴⁹⁷⁷ nachgewiesen werden. Die mtDNA⁴⁹⁷⁷ Deletion wurde im Blut bei 14 der 100 untersuchten unter 12-jährigen Kinder gefunden. Unter den einzelnen Kindern konnte jedoch keine Korrelation zwischen relativer Menge an mtDNA⁴⁹⁷⁷ und dem Alter festgestellt werden ($\chi^2=0,0027$). Die Deletion kam sowohl bei Zweijährigen als auch bei Elfjährigen vor. Der χ^2 Wert stieg auf bis zu 0,0679 wenn Gruppe PJ und Gruppe PM zusammen untersucht wurden und fiel ab wenn zusätzlich Gruppe PA mit einbezogen wurde. Abbildung 8 zeigt, dass die meisten Proben mit dem höchsten relativen Anteil an dmtDNA in Gruppe PM zu finden sind, während die älteren Individuen (PA) eher niedrige Mengen 4977 bp mutierter mtDNA aufwiesen.

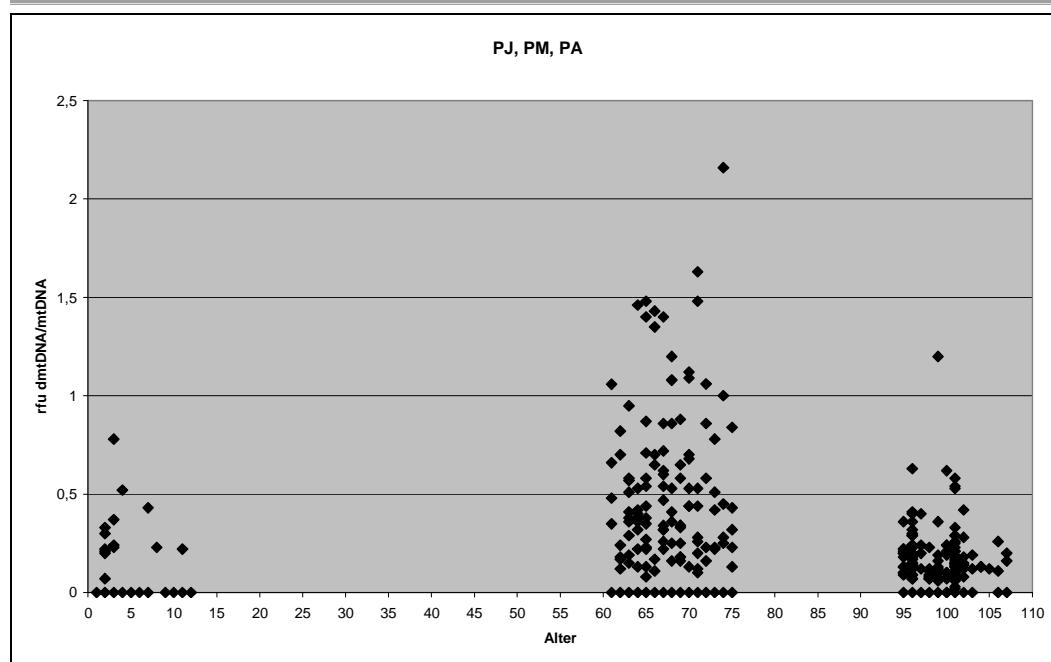


Abb. 8: Verhältniss von dmtDNA zu wtDNA nach DuplexPCR und Kapillarelektrophorese mit einem ABI Prism 310®. Angabe der gemittelten relativen Einheiten der dmtDNA im Blut der verschiedenen Probanden. Schematische Darstellung

Zusätzlich wurde die Gruppe PA in zwei Untergruppen unterteilt: 95-100- und 101-107-Jährige um mögliche Unterschiede im Vorkommen der mtDNA⁴⁹⁷⁷ oder ihrer relativen Menge in diesen zwei Altersgruppen zu überprüfen. 142 Proben von <100 Jahre alten Individuen und 106 Proben von >100 Jahre alten Individuen konnten untersucht werden. Die beiden Gruppen wiesen keinen signifikanten Unterschied gegenüber der einfachen Präsenz oder des relativen Vorkommens an mtDNA⁴⁹⁷⁷ auf (Abb. 9). Tabelle 2 zeigt die Zusammenfassung.

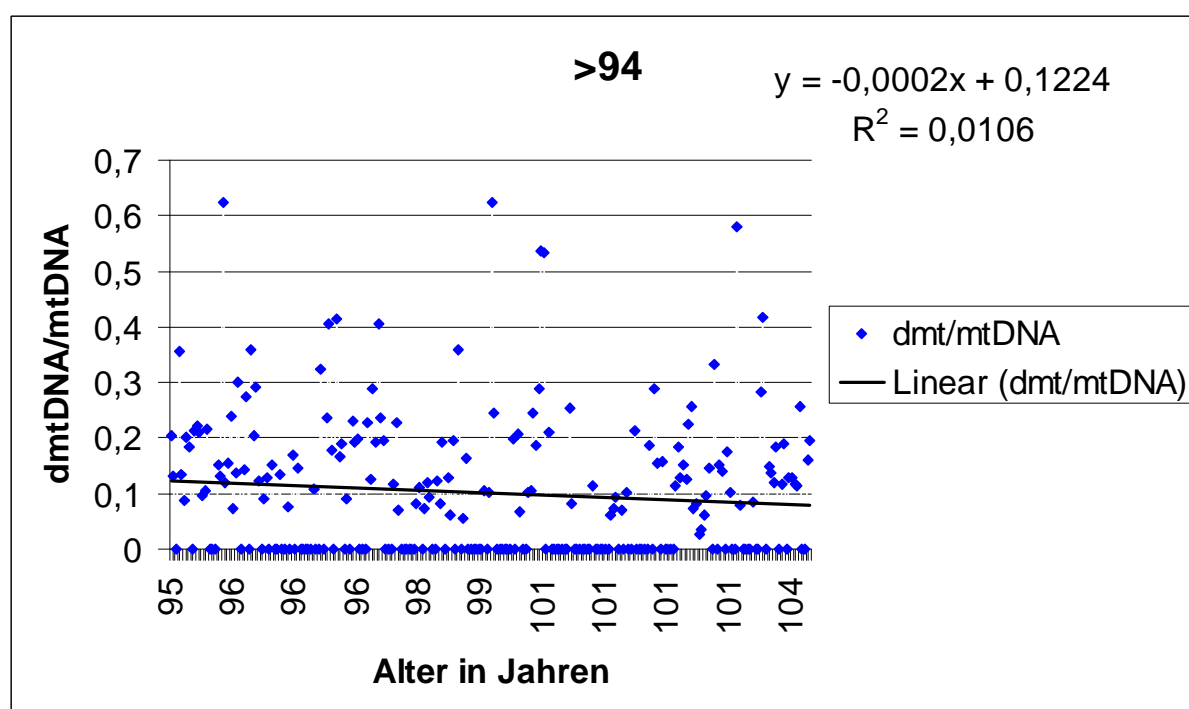


Abb. 9 Verhältniss von dmtDNA zu wtDNA nach DuplexPCR und Kapillarelektrophorese mit einem ABI Prism 310®. Angabe der gemittelten relativen Einheiten der dmtDNA im Blut der verschiedenen Probanden in der Altersgruppe > 94 J. Schematische Darstellung.

Tabelle 2: Ergebnisse der Detektion und der relativen Quantifikation des mtDNA⁴⁹⁷⁷ Produkts nach Duplex-PCR und Kapillarelektrophorese mit dem ABI Prism® 310. Ausgewertet nach Methode2.

	dmtDNA pos. Proben	Mittelwert	Median	Maximum
PJ	14 %	0,04	0	0,78
PM	53,1 %	0,29	0,13	2,16
PA	54,8 %	0,1	0,07	0,63
PA 95-100	57,7 %	0,11	0,09	0,63
PA >100	51,1 %	0,09	0,03	0,58

3.5 Geschlechtsspezifität

Um mögliche geschlechtsbedingte Unterschiede der mitochondrialen Mutationen in den drei Gruppen zu überprüfen, wurden diese zusätzlich nach Geschlechtern getrennt untersucht.

Die erste Gruppe (PJ) bestand aus 55 männlichen und 45 weiblichen Individuen. Spezifisch deletierte mtDNA wurde in 10,91 % der Proben von männlichen und 17,78 % weiblicher Individuen gefunden (Abb. 10). Sie waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich ($p=0.51$).

Die zweite Gruppe (PM) konnte in 60 männliche und 164 weibliche Individuen unterteilt werden. Während das Vorkommen der DNA⁴⁹⁷⁷ bei den weiblichen Individuen geringfügig höher war, 56,1 % der Proben enthielten dmtDNA verglichen mit 45 % Proben von männlichen Individuen (Abb. 10), gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Geschlecht und relativer Menge an DNA⁴⁹⁷⁷ unter Berücksichtigung des Mann-Whitney-U-Test. Die dritte Gruppe (PA) setzte sich aus 61 Männern und 191 Frauen zusammen. Auch bei dieser Gruppe war der Anteil deletierter DNA mit 54,45 % bei den Proben der weiblichen Individuen und 52,46 % bei den männlichen Individuen, nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 10).

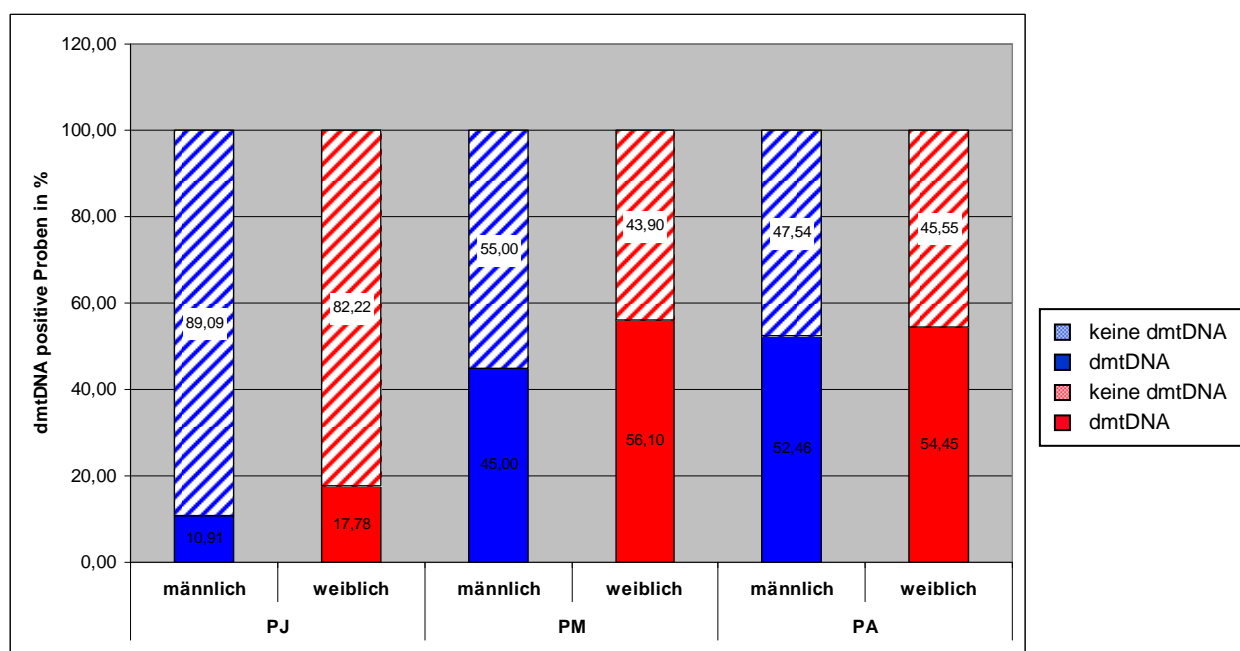


Abb. 10: Prozentuales Vorkommen der dmtDNA⁴⁹⁷⁷ im Blut aller drei Gruppen nach Geschlecht unterteilt. Schematische Darstellung nach Duplex-PCR und kapillarelektrophoretischer Auftrennung.

4 Diskussion

4.1 Proben

4.1.1 Auswahl der Proben

Für diese Studie wurde eine besonders große Anzahl von Proben, sowie ein nicht leicht zugängliches Probandenkollektiv benötigt.

Aus diesem Grund wurden die Blutproben nicht selbst entnommen. Die Proben der Gruppe PJ entstammen dem Routinefundus des Instituts für Rechtsmedizin des UKSH. Diese Blutproben wurden für die vorliegende Arbeit in den Jahren 2004-2005 für Abstammungsanalysen untersucht.

Die Proben der Gruppen PM und PA stellte das Institut für Molekularbiologie des UKSH bereit. Alle Proben wurden derart anonymisiert, dass lediglich Geschlecht und Lebensalter bekannt blieben.

Aufgrund dessen, dass die Blutproben nicht für diese Studie entnommen, sondern von den genannten Instituten zur Verfügung gestellt wurden, war es nicht möglich ein Entnahmeschema zu entwerfen, welches z.B. einen immer gleichen Tageszeitpunkt oder ähnliches berücksichtigen würde. Zudem sind im Rahmen dieser Arbeit z.B. weder der Infektstatus noch der Nikotin- oder Alkoholabusus des Probanden bekannt und können nicht in die Auswertung mit einbezogen werden.

Diese möglichen Fehler sollten allerdings durch das große Probandenkollektiv ausgeglichen sein.

4.1.2 Anzahl der Proben

Wie bereits erwähnt ist die Anzahl der verwendeten Proben im Vergleich zu vorher gelaufenen Studien (Tab.3) sehr hoch. Es wurden insgesamt 652 Proben untersucht und jeweils doppelt bestimmt. Davon konnten nach Methode 2 594 Proben in die Analyse einbezogen werden.

Bisher wurden weder diese Anzahl an Individuen noch dieses Altersspektrum analysiert. So bestand das bisher größte Probandenkollektiv vorheriger Studien aus 117 Proben (Lee et al., 1994), diese umfasste mit einer Altersspanne von 1-98 Jahren auch das größte Altersspektrum. Da die Zellen des thymolymphatischen Systems und die Leukozyten im Vergleich zu Geweben mit hohem Energiebedarf wie z.B. Neurone, Hepatozyten und Muskelzellen verhältnismäßig arm an Mitochondrien

sind (Schmidt, Thews et al., 2000) war hier jedoch, möglicherweise aufgrund der weniger sensitiven Methode, keine Deletion im Blut nachweisbar. Erst Gattermann et al. gelang es 1995 mit sensitiveren Methoden deletierte mtDNA im Blut nachzuweisen. Spätere Studien (Tab. 3) hatten ein maximales Probandenkollektiv von 110 untersuchten Proben und ein maximales Alter von 98 Jahren. Somit unterscheidet sich diese Studie zum einen durch ihr großes Probandenkollektiv und zum anderen durch das erstmalige Untersuchen von Probanden >100 Jahre.

Durch die große Anzahl an Proben in dieser Studie soll der statistische Fehler minimiert und eine wesentlich bessere Aussage ermöglicht werden.

Tab.3: Studien über die 4977 bp dmtDNA im menschlichen Blut. Gezeigt werden die jüngsten Publikationen in Hinblick auf Alter, Anzahl der untersuchten Individuen, die jeweils verwendeten Methoden und die untersuchte Altersspanne.

Altersspanne in Jahren	n	Material	Methode	Ergebnisse	Quelle
1-98	117	Vollblut	Semiquantitative PCR/ serial dilution auf Agarosegelen	<ul style="list-style-type: none"> keine dmtDNA nachweisbar 	(Lee et al., 1994)
4-83	63	venöses Vollblut/ Knochenmark	PCR/ Reamplifikation/ Agarosegel	<ul style="list-style-type: none"> dmtDNA in 35% 	(Gattermann et al., 1995)
48.2+17.7 38,4+9.8	34 20	Peripheres Blut	Nested PCR/ serial dilution auf Agarosegelen	<ul style="list-style-type: none"> Kontrolle u. Pat. Nicht signifikant unterschiedl. 	(Kato et al., 1997)
52-93	10	Vollblut	Nested PCR/ Agarosegel/ Ionenaustausch-chromatografie	<ul style="list-style-type: none"> dmtDNA in 3 von 10 Proben nachweisbar keine Altersabh. 	(Berneburg et al., 1997)
0-86	100	Vollblut (Obduktion)	PCR/ Polyacrylamidgele, Silberfärbung	<ul style="list-style-type: none"> keine dmtDNA >20J. dmtDNA in 50% bei lebenden Probanden u. 65% in Blut aus Obduktionen mögliche geringfügige Altersabhängigkeit 	(von Wurmb et al., 1998)
18-20 73-87	--	Thrombozyten Aus Vollblut	„3 Primer Protokoll“ auf Agarosegel	<ul style="list-style-type: none"> keine dmtDNA in beiden Gruppen 	(Biagini et al., 1998)
23-98	58	Lymphozyten aus peripherem Blut	Large fragment PCR/ Vergleich mit Standards auf Agarosegel	<ul style="list-style-type: none"> keine dmtDNA 	(Drouet et al., 1999)
20-71	10	Vollblut/ Thrombozyten/ PBMCs	Duplex-PCR/ Realtime-Quantifikation	<ul style="list-style-type: none"> keine Altersakkumulation keine Unterschiede zw. den Zelltypen 	(Meissner et al., 2000)
19-61	10	Vollblut/ Granulozyten/ B-Zellen/ T-Zellen	Duplex-PCR/ Automatische Fragmentanalyse Nach Kapillarelektrophorese	<ul style="list-style-type: none"> dmtDNA in allen Zelltypen höchste Anzahl in T-Zellen keine Altersakkumulation 	(Mohamed et al., 2004)
--	65 22	Vollblut	Nested PCR	<ul style="list-style-type: none"> relative Menge an dmtDNA höher bei Patienten mit KHK 	(Botto et al., 2005)
--	110	Vollblut	Realtime-PCR	<ul style="list-style-type: none"> dmtDNA ab 23LJ nachweisbar mögliche Altersabhängigkeit 	(Li et al., 2006)
36.0+8.9 40.3+12.2	13 13	Vollblut	Realtime-PCR	<ul style="list-style-type: none"> dmtDNA Level höher bei Menschen, die N,N-Dimethylformamid ausgesetzt waren 	Shieh et al., 2007

4.2 Vorkommen der 4977 bp Deletion der mtDNA in Blutproben

Das Vorkommen der 4977 bp dmtDNA im Blut wird in vorangegangenen Studien kontrovers diskutiert. In einigen Fällen konnte die Deletion gar nicht (Lee et al., 1994; Drouet et al., 1999) oder nur in einer sehr geringen Anzahl von Individuen gefunden werden (Gattermann et al., 1995).

4.2.1 Relative Quantifikation der dmtDNA

Im Vergleich zur Literatur wurde in dieser Arbeit die spezifische Deletion in einer relativ hohen Anzahl der untersuchten Blutproben gefunden. Insgesamt wiesen unabhängig vom Alter 40,64 % der untersuchten Personen die spezifische 4977 bp Deletion auf. Derartig häufiges Vorkommen der dmtDNA konnten bisher im Blut nicht nachgewiesen werden.

Nachdem Blutproben in früheren Zeiten sogar als Negativkontrollen eingesetzt wurden (Lee et al., 1994), gelang der Nachweis der 4977 bp-Deletion zunächst in einer so genannten „nested“ PCR (Gattermann et al., 1995). Dabei werden zwei Primerpaare verwendet, wobei das zweite Primerpaar einen kleineren Bereich des aus dem ersten Primerpaar entstandenen Produkts amplifiziert. Bald darauf gelang zum ersten Mal der direkte Nachweis der Deletion in Blutproben gesunder Probanden mittels PCR (von Wurmb et al., 1998).

Die Sensitivität der für diese Analyse verwendeten PCR ist sehr hoch, sie ermöglicht den Nachweis eines einzigen Moleküls in Verdünnung. Dies wurde mit Standards nachgewiesen. Daher ist das extrem häufige Auffinden deletionspositiver Proben selbst bei Kindern auf die in dieser Studie verwendete hochempfindliche Untersuchungsmethode zurückzuführen.

4.2.2 Vergleichbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen keine absoluten Werte, die mit Ergebnissen anderer Studien mit anderer Methodik vergleichbar wären. Es wurden relative Werte, basierend auf Fluoreszenzeinheiten, die von der Sensitivität der benutzten PCR abhängen, angegeben. So bedeutet z.B. ein Ratio von 0.5 nicht, dass 50 % deletierte Moleküle vorhanden sind. Die verwendete Methode ist aber besonders geeignet, um drei verschiedene Gruppen, wie in dieser Arbeit, in Bezug auf das Vorhandensein und die Unterschiede bezüglich mehr oder weniger dmtDNA zu überprüfen und dadurch mögliche altersabhängige Unterschiede aufzudecken.

Um die Vergleichbarkeit der Proben sicherzustellen wurde für eine PCR nicht eine Platte (96 Proben) einer Altersgruppe verwendet, sondern jeweils 24 Proben der drei verschiedenen Gruppen. Geringe Abweichungen im Mastermix, als auch eventuelle kleinere Geräteungenauigkeiten würden sich somit nicht nur auf die Ergebnisse einer der Gruppen auswirken, sondern auf alle und machen sie dadurch wieder vergleichbar. Der Vergleich relativer Mengen mit Daten aus der Literatur ist aufgrund der individuellen Methodik nicht möglich. Unterschiedliche PCRs und sogar verschiedene Fragmentanalysen können zu verschiedenen relativen Mengen an dmtDNA führen.

4.3 Auswirkungen von Zellzahlunterschieden auf die 4977 bp Deletion im Blut

Weil es aufgrund des schwer zugänglichen Probandenkollektivs nicht möglich war die Blutentnahme zu standardisieren und da anschließend keine Bestimmung der einzelnen Zellzahlen der unterschiedlichen Blutzellen möglich war, müssen Ungenauigkeiten aufgrund dieser Unterschiede in Betracht gezogen werden.

Den größten Anteil der zellulären Bestandteile des Blutes haben Erythrozyten. Erythrozyten verlieren aber während ihrer Reifung den Zellkern mit der nukleären DNA und sämtliche Zellorganellen. Durch den Verlust der Mitochondrien kann somit die Anzahl der Erythrozyten keinen Einfluss auf die Menge an dmtDNA haben. Eine Ausnahme stellen die zu etwa 0,5 % physiologisch im Blut vorkommenden unreifen Erythrozyten, die so genannten Retikulozyten dar. Diese können noch Bestandteile von Zellorganellen enthalten und somit den Anteil der mtDNA beeinflussen.

Als weiterer Bestandteil der Blutzellen enthalten Thrombozyten zwar keinen Zellkern, aber Mitochondrien. Damit könnten Abweichungen in der Anzahl der Thrombozyten im Blut Einfluss auf die analysierten Werte für mtDNA nehmen. Sowohl die Werte für Erythrozyten, Retikulozyten als auch Thrombozyten sind im Vergleich zu den Leukozyten relativ konstant und unterliegen nur relativ geringen intraindividuellen Schwankungen. Daraus und aufgrund der großen Anzahl von Proben kann ihr Einfluss auf die analysierten DNA-Werte als gering gewertet werden.

Die Leukozyten machen den größten Anteil der mitochondrientragenden Zellen im Blut aus und ihre Anzahl liefert somit das größte Potential für Ungenauigkeiten. Schon bei leichteren Infektionen kann es zum Anstieg der Leukozytenzahl über die

Normgrenze kommen. Außerdem kann auch eine ungesunde Lebensweise wie z.B. Rauchen und regelmäßiger Alkoholkonsum zu einer Erhöhung der Leukozytenzahl führen (Schwartz et al., 1994; Parry et al., 1997).

Ein für diese Arbeit wichtiges Phänomen ist die altersbedingte Immunschwäche, die durch eine Abnahme der Leukozytenzahl im Alter verursacht wird (Pawelec et al., 2002).

Die in dieser Studie verwendete Duplex-PCR gibt sowohl die Werte für die vorhandene wtDNA als auch dmtDNA⁴⁹⁷⁷ an. Bildet man nun das Ratio aus beiden, so erhält man die Anzahl der Deletion bezogen auf die Anzahl der nicht deletierten DNA und kann somit den Faktor der unterschiedlichen Zellzahl herauskürzen.

Höhere Zellzahlen bedeuten jedoch auch eine höhere Replikationsrate der Zellen und somit eine größere Wahrscheinlichkeit für Mutationen, weshalb zu einer weiteren Abklärung dieses Faktors eine Studie mit Messung der Zellzahlen vor DNA-Extraktion nötig wäre.

4.4 Menge der mtDNA und Langlebigkeit

Varianten und Mutationen der mtDNA werden als genetische Faktoren des gesunden Alterns in Betracht gezogen. Die Fähigkeit der Zelle mit somatischen mtDNA-Mutationen, entweder dadurch, sie zu verhindern oder sie effizient zu reparieren, umzugehen, könnte eine wichtige Rolle im Kampf gegen den funktionellen Rückgang sein und dadurch zu einem "Langlebigkeits-Phänotyp" beitragen (Santoro et al., 2006). Die hochbejahrten Individuen der Gruppe PA repräsentieren die höchsten Altersperzentilen verglichen mit ihrer Geburtskohorte (>95. Perzentile) und sind häufig durch eine Verlangsamung des Alterungsprozesses und durch das Ausbleiben oder den verspäteten Eintritt von altersbedingten Krankheiten gekennzeichnet (Nebel et al., 2005). Es haben bisher schon einige Studien über Hundertjährige vererbte Varianten und somatische Mutationen mit Langlebigkeit in Zusammenhang gebracht (De Benedictis et al., 1999; Zhang et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein statistisch relevanter Anstieg der mtDNA⁴⁹⁷⁷ im Blut von Kindern zu Erwachsenen beobachtet. Sowohl in Bezug auf die Anzahl der betroffenen Individuen, als auch die Menge der deletierten Moleküle (Abb. 8 und Tab. 2).

Die Tatsache, dass die Gruppen der 60-75-Jährigen und die der 95-107-Jährigen zwar ähnliche dmtDNA-Häufigkeiten aufwiesen (53,1 vs. 55,2 %), die individuelle Menge der deletierten Moleküle der 95-107-Jährigen im Durchschnitt allerdings sehr viel geringer war (siehe Abb. 9), könnte einen Hinweis darauf geben, dass die Mutation bei den sehr alten -trotz ihres Alters- nicht so stark akkumulieren wie bei den um einige Dekaden jüngeren 60-75-Jährigen.

Eine interessante Frage, die sich in diesem Zusammenhang auftut ist, ob die 95-107-Jährigen –verglichen mit anderen Personen des gleichen Jahrgangs- schon in jüngeren Jahren weniger mtDNA⁴⁹⁷⁷-Moleküle aufwiesen und somit die so geringe Menge an mtDNA⁴⁹⁷⁷ schon das ganze Leben hatten oder ob es erst später im fortgeschrittenen Alter auftritt. Um auf diese Fragen eine Antwort zu finden wäre ein prospektives Studiendesign nötig, da mit den für diese Arbeit herangezogenen Querschnittsdaten keine Aussage dazu zu treffen ist.

Eine weitere Frage, die sich stellt, ist welche Faktoren zu den erstaunlichen Ergebnissen bei den 95-107-Jährigen beigetragen haben könnten.

4.4.1 Endogene Einflüsse

Vorangegangene Arbeiten weisen bereits auf einen genetischen Beitrag zur Langlebigkeit hin (Niemi et al., 2005; Christensen et al., 2006). Es könnten sowohl Variationen in bestimmten Genen der mtDNA als auch der nukleären Gene und Interaktionen zwischen ihnen helfen einen DNA-Schaden durch effizientere antioxidative Enzyme oder Reparaturmechanismen zu kompensieren oder zu verhindern (Santoro et al., 2006). Sowohl genetische als auch Umwelteinflüsse müssen nicht allein mutationsauslösend sein und könnten potentiell einander beeinflussen.

4.4.2 Exogene Einflüsse

Eine alternative oder additive Erklärung wäre der Einfluss von exogenen Faktoren. Mehrere Umweltparameter sind bekannt dafür, DNA zu beschädigen und zu vorübergehendem und/oder persistierendem Anstieg des Anteils an mtDNA⁴⁹⁷⁷ im Blut zu führen. Hierzu gehören Alkohol (von Wurmb-Schwark et al., 2007), ungesunde Ernährung (Harman et al., 1992), Rauchen (Tan et al., 2008), UV-Licht (Partridge et al., 2009) und bestimmte Medikamente (Casula et al., 2005). Daher

wäre es möglich, dass die 95-107-Jährigen einen gesünderen Lebensstil aufweisen oder seltener schädlichen Umweltfaktoren ausgesetzt waren.

Des Weiteren gibt es auch antimutagenetische Stoffe wie z.B. grüner Tee. Iwai et al. beschrieben 2006 eine Minderung der 4977 bp-Deletion in mtDNA von Leukozyten nach fünfwöchigem Teekonsum.

Diese Ergebnisse könnten die Vermutung bestätigen, dass ein gesunder Lebensstil durchaus dazu führen kann, dass Deletion verursachende schädigende Einflüsse kompensiert werden könnten.

Man nimmt an, dass Blutzellen aufgrund ihrer extremen Kapazität sich zu erneuern, nur einen Ausschnitt des Mutationsgeschehens widerspiegeln, das kurz vor der Blutentnahme stattgefunden hat.

Da man davon ausgehen kann, dass die Personen der Gruppe PA mittlerweile ein passiveres Leben, mit beschränkterer Nahrungsaufnahme, weniger körperlicher Anstrengung und geringerer Wahrscheinlichkeit für exzessiven Alkoholkonsum oder Rauchen, als 60-75-Jährige führen, könnte sich dies in einer geringeren Produktion von ROS auswirken und dadurch zu weniger Schaden an ihrer DNA führen.

Diese Studie hat somit gezeigt, dass die 4977 bp Deletion im Blut nicht mit dem Alter akkumuliert. Es kann also angenommen werden, dass diese Deletion eher als Lifestylemarker denn als Alternsmarker anzusehen ist. Dieses würde auch die Schwankungen im Zeitverlauf in vorangegangenen Arbeiten erklären (Jelkmann, 2008)

Für weiterführende Studien wäre es sinnvoll eine Infektanamnese vor der Blutentnahme zu erheben, sowie Informationen über das gesundheitsschädigende Verhalten (Rauchen, Alkohol, Stress, etc.) zu erfragen. Eine weitere Möglichkeit wäre ein Differentialblutbild zu erstellen und somit die genaue Verteilung der einzelnen Zellen zu dokumentieren um dies ggf. in die Auswertung mit einfließen lassen zu können.

Auch eine Erweiterung der Methodik wie z.B. die Doppelbestimmung mittels Duplex-PCR und Realtime-PCR könnten weitere Erkenntnisse liefern.

5 Zusammenfassung

Die 4977 bp Deletion der mitochondrialen DNA findet sich häufig in Geweben mit hohem Sauerstoffbedarf und niedriger Mitoserate, wie z.B. Gehirn, Herz- und Skelettmuskel. In diesen Geweben scheint es zu einer altersabhängigen Anhäufung dieser Deletion zu kommen. Doch auch in sich schnell replizierenden Geweben wie z.B. Blut kommt die dmtDNA⁴⁹⁷⁷, wenn auch in sehr viel geringerem Ausmaß vor. Eine altersabhängige Akkumulation der dmtDNA⁴⁹⁷⁷ wurde schon viel diskutiert, konnte jedoch bisher weder verlässlich ausgeschlossen noch nachgewiesen werden.

Aufgrund dessen wurden in dieser Studie eine hohe Anzahl von Blutproben von insgesamt 572 Individuen aus verschiedenen Altersgruppen (1-12, 60-75 und 95-110 Jahre) hinsichtlich des Vorkommens der dmtDNA⁴⁹⁷⁷ untersucht. Damit wurde ein bisher noch nicht untersuchtes Probandenkollektiv von 572 Individuen im Alter von 1-110 Jahren ausgewählt.

Es wurde eine höchst sensitive und verlässliche Duplex-PCR verwendet, welche eine relative Quantifikation der dmtDNA⁴⁹⁷⁷ ermöglicht. Die Ergebnisse zeigen einen statistisch relevanten Anstieg der dmtDNA⁴⁹⁷⁷ von den 1- bis 12-Jährigen Kindern zu den 60-75-jährigen, sowohl in Bezug auf die Anzahl der betroffenen Individuen als auch die Anzahl der deletierten Moleküle. Bei den 95- bis 110-Jährigen zeigte sich die Mutation nur in einem geringeren Ausmaß als bei den 60- bis 75-Jährigen und es konnte somit kein altersabhängiger Anstieg verzeichnet werden. Auch in den einzelnen Gruppen zeigte sich keine Altersabhängigkeit der Deletion. Die Tatsache, dass ein Abfall an der Deletionsrate bei den sehr alten Individuen zu verzeichnen ist, könnte sowohl durch genetische als auch durch Lifestylefaktoren wie z.B. Alkohol und Nikotinkonsum bedingt sein. Aufgrund der hohen Erneuerungsrate der Blutzellen besteht die Möglichkeit, dass die dmtDNA⁴⁹⁷⁷ der Leukozyten nur einen kleinen Ausschnitt des Mutationsgeschehens widerspiegelt, welches sich in einer relativ kurzen Zeitperiode vor der Entnahme der Blutprobe abgespielt hat. Demnach wären die niedrigeren Level an dmtDNA⁴⁹⁷⁷ der 95- bis 110-Jährigen auf einen, auf ihr Alter zurückzuführenden, gesünderen und passiveren Lebensstil und somit weniger DNA-Schädigung zurückzuführen und somit als Lifestylemarker zu werten. In diesem Punkt bedarf es weiterer Forschung.

6 Anhang

6.1 Alphabetische Chemikalienliste

- Agarose SeaKem® LE, BMA
- Ethanol vergällt (99 % Ethylalkohol vergällt mit 1 % Methyl-Ethyl-Keton (MEK))
- Aqua dest. , J.T. BAKER
- Dimethylsulfoxid (DMSO), QBIOSYSTEM
- DNA-Ladepuffer
- DNTP Mix Conc: 2,5 mM each, BIOLINE
- Ethanol 95 %
- Ethidiumbromid (10 mg/ml), INVITROGEN
- Formamid, GIBCO
- GeneScan™ 500 Rox™ Size Std, APPLIED BIOSYSTEM
- Hi-Di™ Formamide, APPLIED BIOSYSTEM
- Hyperladder™ I (Leiter), BIOLINE
- ImmoBuffer 10 x, BIOLINE
- Immolase DNA Pol. 5 u/µl, BIOLINE
- NucleoSpin® Blood Quick Pure Kit, MACHEREY NAGEL
- MgCl₂ 50 mM, BIOLINE
- Primer (L15/H16) verdünnt, ROTH
- Primer (IL35/H45) verdünnt, ROTH
- TBE 1 x (Tris, Borsäure, EDTA, Aqua dest.)

6.2 Ansatz von Gebrauchslösungen

Agarosegel	1 g Agarose für ein 1 % iges Gel in 100 ml 1x TBE lösen, aufkochen, abkühlen lassen auf ca. 70 °C. Danach 5 µl Ethidiumbromidlösung hinzupipettieren. Flüssiges Gel in die Gelkammer gießen und die kämme einsetzen. Gel 30 min bei Raumtemperatur auspolymerisieren lassen.
DNA-Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylen Cyanol, 25 % Ficoll 400,
TBE-Puffer (10x)	860 mM Borsäure, 20 mM EDTA, 890 mM Tris HCL, auf pH 8,3 einstellen.
TE-Puffer (Tris-EDTA)	10 mM Tris, 0,2 mM EDTA, auf pH 7,5 einstellen.

6.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

DNA-Extraktion

- NucleoSpin® Blood Quick Pure, MACHERY-NAGEL

Agarose-Gelelektrophorese

- Mini – Elektrophoresekammer, ROTH
- Spannungsgerät 2297, Bromma
- Gel Doc EQ, BIO-RAD
- Mikrowave 800, SEVERIN
- PCR Softtubes 0,5 ml, BIOZYM

PCR

- Template Tamer, CONCOR
- Thermocycler GeneAmp® PCR System 2700, APPLIED BIOSYSTEMS
- PCR Softtubes 0,2 ml, BIOZYM

Fragmentanalyse

- ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, APPLIED BIOSYSTEMS
- GeneScan® Analysis Software Version 3.1.2, APPLIED BIOSYSTEMS
- Reaktionsgefäße 0,5 ml, APPLIED BIOSYSTEMS
- Gummisepta für 0,5 ml Reaktionsgefäße, APPLIED BIOSYSTEMS

6.4 Abkürzungen

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
dmtDNA ⁴⁹⁷⁷	4977 bp deletierte mtDNA
dmtDNA	deletierte mitochondriale DNA
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
FA	Fragmentanalyse
g	Gramm
G	Guanin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
MM	Mastermix
mM	Millimol
mtDNA	mitochondriale DNA
ng	Nanogramm
nDNA	nukleäre DNA
PA	Probe von alten Probanden (95-109J.)
Pat.	Patient
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PJ	Probe von jungen Probanden (1-12J.)
PM	Probe von mittelalten Probanden (60-75J.)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
rfu	Relative Fluorescence Units
rpm	Umdrehungen pro Minute
T	Thymin
wmtDNA	Wildtyp mtDNA (=Gesamt-mtDNA)

6.5 Tabellen

Tab. 4: Temperaturprofil für die verwendete Duplex-PCR.

Schritt	Vorgang	Temperatur	Dauer	Temperaturzyklen
1.	Denaturierung	94 °C	5 min	40 Zyklen
2.	Denaturierung	94 °C	1 min	
3.	Annealing	55 °C	1 min	
4.	Extension	72 °C	2 min	
5.		72 °C	7 min	
6.		10 °C	∞	

Tab. 5: Ansatz für die Duplex-PCR (Volumina für eine Probe PJ).

Zusammensetzung	Volumen (7,5 µl)
Primer L15/H16	0,075 µl
Primer L35/H45	0,25 µl
Immobuffer 10 x	1,25 µl
MgCl ₂ , 50 mM	0,375 µl
dNTPs, je 2,5 mM	1,0 µl
Dimethylsulfoxid (DMSO), 100 %	0,5 µl
Immolase, 5 U/µl	0,1 µl
Aqua bidest	3,95 µl

Tab. 6: Ansatz für die Duplex-PCR (Volumina für eine Probe PM und PA).

Zusammensetzung	Volumen (12,5 µl)
Primer L15/H16	0,075 µl
Primer L35/H45	0,25 µl
Immobuffer 10 x	1,25 µl
MgCl ₂ , 50 mM	0,375 µl
dNTPs, je 2,5 mM	1,0 µl
Dimethylsulfoxid (DMSO), 100 %	0,5 µl
Immolase, 5 U/µl	0,1 µl
Aqua bidest	8,95 µl

6.6 Rohdaten

Rohdaten der Gruppe PJ

Lauf1					Lauf2				
		wt	del	ratio dmt/mt			wt	del	ratio dmt/mt
1	PJ	31326		0	1	PJ	18304		0
2	PJ	41933		0	2	PJ	94899		0
3	PJ	39433		0	3	PJ	103849		0
4	PJ				4	PJ	94541		0
5	PJ	21530		0	5	PJ	92333		0
6	PJ	50297		0	6	PJ	101197		0
7	PJ	32828		0	7	PJ	100706		0
8	PJ	37929		0	8	PJ	124574		0
9	PJ	13086	4145	0,31675073	9	PJ	107543		0
10	PJ	38288		0	10	PJ	93525		0
11	PJ				11	PJ	102126		0
12	PJ	40982		0	12	PJ	133030		0
13	PJ	58874		0	13	PJ	106039		0
14	PJ	69380		0	14	PJ	102057	79195	0,77598793
15	PJ	44117		0	15	PJ	105883		0
16	PJ				16	PJ	109008	143907	1,32015081
17	PJ	47568		0	17	PJ	103365	108689	1,0515068
18	PJ	42297	8146	0,19259049	18	PJ	105261	55140	0,52384074
19	PJ	34714		0	19	PJ	103250		0
20	PJ	25956		0	20	PJ	106767	117554	1,10103309
21	PJ	108665		0	21	PJ	115238		0
22	PJ	71598		0	22	PJ	107066	89119	0,83237442
23	PJ	109242		0	23	PJ	116265	26195	0,22530426
24	PJ	108427		0	24	PJ	121765		0
25	PJ	65810		0	25	PJ	105540	20854	0,19759333
26	PJ	67174		0	26	PJ	112092	41670	0,37174821
27	PJ	100994		0	27	PJ	104895		0
28	PJ	67674	4373	0,06461861	28	PJ	120330		0
29	PJ	108440		0	29	PJ	109811		0
30	PJ	107174		0	30	PJ	102970		0
31	PJ	93129	8010	0,08600973	31	PJ	110058	74398	0,67598902
32	PJ	107598		0	32	PJ	101560		0
33	PJ	106829		0	33	PJ	101334	118717	1,17154163
34	PJ	110200		0	34	PJ	131088		0
35	PJ	117546		0	35	PJ	131636	100083	0,76030113
36	PJ	114562		0	36	PJ	124594		0
37	PJ	109620		0	37	PJ	115485		0
38	PJ	88934		0	38	PJ	107741		0
39	PJ	111081		0	39	PJ	108800		0
40	PJ	105357		0	40	PJ	106710		0
41	PJ	10992		0	41	PJ	111969		0
42	PJ	87583		0	42	PJ	116331		0
43	PJ	92702		0	43	PJ	139356		0
44	PJ	88106	12399	0,14072821	44	PJ	179354	85060	0,47425761
45	PJ	56785		0	45	PJ	111619	95067	0,85170983
46	PJ	97302		0	46	PJ	117613		0
47	PJ	68980		0	47	PJ	109057		0
48	PJ	82349		0	48	PJ	99914		0

49	PJ	86449		0
50	PJ	84375		0
51	PJ	60363		0
52	PJ	56879		0
53	PJ	64452		0
54	PJ	83725		0
55	PJ	82446		0
56	PJ	91685		0
57	PJ	81832		0
58	PJ	87805		0
59	PJ	79276		0
60	PJ	88593		0
61	PJ	91267		0
62	PJ	97312		0
63	PJ	68735		0
64	PJ	94207		0
65	PJ	68838		0
66	PJ	67443		0
67	PJ	96030		0
68	PJ	48070		0
69	PJ	85481		0
70	PJ	86154		0
71	PJ	98665	15003	0,15206
72	PJ	99858	18789	0,18815718
73	PJ	82057	22508	0,27429713
74	PJ	121410		0
75	PJ	96923	46154	0,47619244
76	PJ	85031	16034	0,18856652
77	PJ	88859		0
78	PJ	81259		0
79	PJ	86181		0
80	PJ	102020		0
81	PJ	83398	26248	0,31473177
82	PJ	91262	62080	0,68023931
83	PJ	101483		0
84	PJ	109405	106448	0,97297198
85	PJ	89121		0
86	PJ	100421	61043	0,60787086
87	PJ	99154		0
88	PJ	88776		0
89	PJ	95469		0
90	PJ	96971		0
91	PJ	103784		0
92	PJ	88757		0
93	PJ	104811	91364	0,8717024
94	PJ	88110		0
95	PJ	72844		0
96	PJ	125781	47754	0,37965989
97	PJ	85544	18525	0,21655522
98	PJ	80752		0
99	PJ	82852		0
100	PJ	78241		0

49	PJ	120737		0
50	PJ	142164	94985	0,6681368
51	PJ	89087	20484	0,22993254
52	PJ	65379	21374	0,32692455
53	PJ	78573		0
54	PJ	64316		0
55	PJ	87839		0
56	PJ	92456	32716	0,35385481
57	PJ	90806		0
58	PJ	87558	19589	0,22372599
59	PJ	101667	21495	0,21142554
60	PJ	92354	22465	0,2432488
61	PJ	96378		0
62	PJ	103727	23055	0,22226614
63	PJ	96412		0
64	PJ	90856		0
65	PJ	62842		0
66	PJ	77144		0
67	PJ	76824		0
68	PJ	102004		0
69	PJ	96573		0
70	PJ	89771	101694	1,13281572
71	PJ	122350		0
72	PJ	129015		0
73	PJ	105319		0
74	PJ	107555		0
75	PJ	105345		0
76	PJ	105708		0
77	PJ	104072		0
78	PJ	116585		0
79	PJ	117345	36041	0,30713707
80	PJ	112501		0
81	PJ	108461		0
82	PJ	125451		0
83	PJ	117588		0
84	PJ	112058		0
85	PJ	103059		0
86	PJ	139096		0
87	PJ	124168	337250	2,71607822
88	PJ	109481		0
89	PJ	88987		0
90	PJ	116300		0
91	PJ	100723		0
92	PJ	114118		0
93	PJ	97198		0
94	PJ	87342		0
95	PJ	85852		0
96	PJ	106196		0
97	PJ	122504		0
98	PJ	96770		0
99	PJ	125112		0
100	PJ	137550		0

Rohdaten der Gruppe PM

Platte A					AGcont01	Platte B				
		wt	del	ratio dmt/mt				wt	del	ratio dmt/mt
1	1H	29194		0		1	1H	80763	26222	0,32467838
2	1G	91491		0		2	1G	58483	23091	0,39483269
3	1F	105788	10091	0,09538889		3	1F	66868	27352	0,40904469
4	1E	132203		0		4	1E	72001		0
5	1D	133185		0		5	1D	88537		0
6	1C	133675	55012	0,41153544		6	1C	95293	46329	0,48617422
7	1B	127100		0		7	1B	75945		0
8	1A					8	1A	69828		0
9	2H	121149		0		9	2H	83851	91195	1,08758393
10	2G	126493		0		10	2G	93730		0
11	2F	123944		0		11	2F	64570	38790	0,60074338
12	2E	119747	18859	0,15749038		12	2E	80089	112241	1,40145338
13	2D	124002		0		13	2D	47855	39825	0,83220144
14	2C	110603	15499	0,14013182		14	2C	89818	21889	0,24370393
15	2B	124636	28225	0,22645945		15	2B	76348		0
16	2A	115836		0		16	2A	74665		0
17	3H	119144		0		17	3H	78301	71740	0,91620797
18	3G	122075	42844	0,35096457		18	3G	73563	52680	0,71612088
19	3F	124282		0		19	3F	60482		0
20	3E	125408		0		20	3E	45009		0
21	3D	KONTROLLE				21	3D	KONTROLLE		
22	3C	KONTROLLE				22	3C	KONTROLLE		
23	3B	107219	19188	0,17896082		23	3B	61549	2311	0,03754732
24	3A	127569		0		24	3A	71185		0
25	4H	125132		0		25	4H	70206	9969	0,14199641
26	4G	128153		0		26	4G	69480		0
27	4F	127605	137444	1,07710513		27	4F	54239		0
28	4E	129671		0		28	4E	67494		0
29	4D	122230	131469	1,07558701		29	4D	63966		0
30	4C	126689		0		30	4C	78901		0
31	4B	104901		0		31	4B	51203		0
32	4A	129112	129580	1,00362476		32	4A	80775		0
33	5H	128595		0		33	5H	63973		0
34	5G	113893		0		34	5G	43273		0
35	5F	113655		0		35	5F	61102		0
36	5E	122877		0		36	5E	45345		0
37	5D	112910		0		37	5D	51162		0
38	5C	116917		0		38	5C	46108		0
39	5B	113143	25964	0,22947951		39	5B	75058		0
40	5A	131108	86686	0,6611801		40	5A	72851		0
41	6H	121062	84860	0,70096314		41	6H	56509		0
42	6G	125047	107908	0,86293953		42	6G	47821		0
43	6F	118058	102292	0,86645547		43	6F	62367		0
44	6E	127432		0		44	6E	49019		0
45	6D	101723	60535	0,59509649		45	6D	51244		0
46	6C	108288	130882	1,20864731		46	6C	73655		0
47	6B	119233		0		47	6B	65841		0

Anhang

48	6A	124642	102184	0,81981996
49	7H	67365		0
50	7G	60776		0
51	7F	42518		0
52	7E	67676		0
53	7D	85182		0
54	7C	38210		0
55	7B	52602		0
56	7A	66219		0
57	8H	87142		0
58	8G	63964		0
59	8F	56191		0
60	8E	63819		0
61	8D	55692		0
62	8C	82396		0
63	8B	67820	9902	0,14600413
64	8A	80131	54514	0,68031099
65	9H	81206		0
66	9G	78190		0
67	9F	120240		0
68	9E	101270		0
69	9D	82378		0
70	9C	90299		0
71	9B	76099	13123	0,17244642
72	9A	41105		0
73	10H	106528		0
74	10G	93990		0
75	10F	105114	99410	0,94573511
76	10E	105200	89776	0,85338403
77	10D	KONTROLLE		
78	10C	114195		0
79	10B	113668	127194	1,11899567
80	10A	112331		0
81	11H	125636		0
82	11G	113199	172217	1,52136503
83	11F	94345	79736	0,84515343
84	11E	106106		0
85	11D	106282		0
86	11C	114181	45962	0,40253632
87	11B	90758	52616	0,57973953
88	11A	111815		0
89	12H	KONTROLLE		
90	12G	98996		0
91	12F	96084		0
92	12E	88908	8914	0,10026094
93	12D	124311		0
94	12C	101059	34858	0,34492722
95	12B	107046		0
96	12A	126680		0

48	6A	52039		0
49	7H	58368		0
50	7G	55369	52688	0,9515794
51	7F	66478	14964	0,22509702
52	7E	86042		0
53	7D	59943		0
54	7C	59948		0
55	7B	65453		0
56	7A	75082	19512	0,25987587
57	8H	58486		0
58	8G	79879	20289	0,25399667
59	8F	56509		0
60	8E	43115	14821	0,34375507
61	8D	50072	16143	0,32239575
62	8C	30232		0
63	8B	61589	16098	0,26137784
64	8A	60724		0
65	9H	75923	28816	0,37954243
66	9G	54259	30745	0,56663411
67	9F	52577	8474	0,16117314
68	9E	56064	9878	0,1761915
69	9D	69184		0
70	9C	52673	11668	0,22151767
71	9B	83106	21699	0,26110028
72	9A	21166		0
73	10H	105086	20351	0,19366043
74	10G	105638		0
75	10F	105466	23011	0,21818406
76	10E	98409	191619	1,94716947
77	10D	KONTROLLE		
78	10C	108530	45538	0,41958905
79	10B	112220		0
80	10A	1734		0
81	11H	111344	31191	0,28013184
82	11G	108786	64695	0,59469969
83	11F	87524	51487	0,58826151
84	11E	107185	50132	0,46771147
85	11D	87322		0
86	11C	102829	26500	0,2577094
87	11B	106076		0
88	11A	109444		0
89	12H	KONTROLLE		
90	12G	106306		0
91	12F	111972	15432	0,13782017
92	12E	106179		0
93	12D	108824		0
94	12C	101154		0
95	12B	104440	19470	0,18642283
96	12A	103296		0

Platte C					AGcont02	Platte D				
		wt	del	ratio dmt/mt				wt	del	ratio dmt/mt
1	1H	127297		0		1	1H	84233	18229	0,21641162
2	1G	139113		0		2	1G	89520	12538	0,14005809
3	1F	121595		0		3	1F	51671	32157	0,62234135
4	1E	123673		0		4	1E	99595	12666	0,12717506
5	1D	119448	95914	0,80297703		5	1D	99273	28071	0,28276571
6	1C	183092	120228	0,65665349		6	1C	91821	32542	0,35440694
7	1B	122085		0		7	1B	98287	143904	1,46412038
8	1A	149595	64204	0,42918547		8	1A	97584	50150	0,51391622
9	2H	119427		0		9	2H	89493	96375	1,07689987
10	2G	132512		0		10	2G	47429	25620	0,54017584
11	2F	119053		0		11	2F	84209		0
12	2E	122030	125882	1,03156601		12	2E	95611	34333	0,35909048
13	2D	114488	38456	0,33589547		13	2D	84686		0
14	2C	108417		0		14	2C	86424	18974	0,2195455
15	2B	133849		0		15	2B	86391	30550	0,3536248
16	2A	114279		0		16	2A	94016	38921	0,41398273
17	3H	142510		0		17	3H	101814	84977	0,83462982
18	3G	112403		0		18	3G	96634	11999	0,12416955
19	3F	123799	182784	1,47645781		19	3F	85658		0
20	3E	108521	49291	0,45420702		20	3E	87999	33217	0,3774702
21	3D	KONTROLLE				21	3D	KONTROLLE		
22	3C	KONTROLLE				22	3C	KONTROLLE		
23	3B	101757	80536	0,79145415		23	3B	113722	6639	0,05837921
24	3A	105555		0		24	3A	92915	12182	0,13110908
25	4H	127101		0		25	4H	63579		0
26	4G	118106		0		26	4G	86371		0
27	4F	126537		0		27	4F	51680		0
28	4E	98278		0		28	4E	54001		0
29	4D	14989		0		29	4D	79975		0
30	4C	125853		0		30	4C	53218	60465	1,13617573
31	4B	114061	86776	0,7607859		31	4B	59155	15142	0,2559716
32	4A	84932	216169	2,54520087		32	4A	51825	21592	0,4166329
33	5H	81519		0		33	5H	68844		0
34	5G	96825		0		34	5G	65523		0
35	5F	70675		0		35	5F	56554		0
36	5E	89816	128019	1,42534738		36	5E	71579		0
37	5D	93553	202471	2,16423845		37	5D	72259		0
38	5C	119348		0		38	5C	71491		0
39	5B	117033		0		39	5B	74507		0
40	5A	92656	129771	1,40056769		40	5A	71799	7812	0,10880374
41	6H	111208		0		41	6H	71837		0
42	6G	86400	13529	0,15658565		42	6G	64043		0
43	6F	7264		0		43	6F	76722	36390	0,47430985
44	6E	75201		0		44	6E	79402	44153	0,55606912
45	6D	102690	70113	0,68276366		45	6D	61830	16588	0,268284
46	6C	90836	80236	0,88330618		46	6C	63951		0
47	6B	99500	0	0		47	6B	66383		0
48	6A	80913	100291	1,2394918		48	6A	117375	18557	0,15810011
49	7H	92665		0		49	7H	72490	8631	0,1190647
50	7G	68343	19629	0,28721303		50	7G	41891	6895	0,16459383

51	7F	70752		0
52	7E	73945	21738	0,29397525
53	7D	69460		0
54	7C	74824		0
55	7B	79181	9051	0,11430773
56	7A	52415		0
57	8H	70138		0
58	8G	82197		0
59	8F	74054		0
60	8E	66532		0
61	8D	64688		0
62	8C	64442		0
63	8B	92827	33821	0,36434443
64	8A	57421	5750	0,10013758
65	9H	78095		0
66	9G	77420		0
67	9F	74457		0
68	9E	76497		0
69	9D	39764		0
70	9C	75335		0
71	9B	75183	10788	0,14348988
72	9A	64468	7695	0,11936154
73	10H	88210		0
74	10G	68991		0
75	10F	90403	90952	1,00607281
76	10E	69825		0
77	10D	KONTROLLE		
78	10C	90749		0
79	10B	92141		0
80	10A	86248		0
81	11H	100617		0
82	11G	59066		0
83	11F	79651		0
84	11E	99731		0
85	11D	78303		0
86	11C	87956	93053	1,05794943
87	11B	70373	25698	0,36516846
88	11A	76873	125623	1,63416284
89	12H	KONTROLLE		
90	12G	69374	76041	1,09610229
91	12F	60742		0
92	12E			
93	12D	82367		0
94	12C	74314	43496	0,58530021
95	12B	57936	84797	1,46363228
96	12A	48453		0

51	7F	83667	36364	0,43462775
52	7E	75015	12982	0,17305872
53	7D	59301		0
54	7C	62138	13762	0,22147478
55	7B	46877		0
56	7A	85569	32864	0,38406432
57	8H	51542		0
58	8G	36397	7980	0,21924884
59	8F	53219		0
60	8E	45793		0
61	8D	25708		0
62	8C	34667		0
63	8B	51955	24026	0,46243865
64	8A	24822		0
65	9H	73445		0
66	9G	70543		0
67	9F	38333		0
68	9E	54397		0
69	9D	35979	5256	0,14608522
70	9C	47682	8549	0,17929198
71	9B	52661	6407	0,12166499
72	9A	61669	31513	0,51100229
73	10H	102158		0
74	10G	99403	46617	0,46896975
75	10F	103954	16271	0,15652115
76	10E	89743	9536	0,10625898
77	10D	KONTROLLE		
78	10C	104280	11925	0,11435558
79	10B	98546	31682	0,32149453
80	10A	106519		0
81	11H	109666	12748	0,11624387
82	11G	102905		0
83	11F	109109		0
84	11E	119156		0
85	11D	100922		0
86	11C	93300		0
87	11B	96593	31698	0,32816043
88	11A	102427		0
89	12H	KONTROLLE		
90	12G	101561	15054	0,14822619
91	12F	103848		0
92	12E	85386	12240	0,14334903
93	12D	102761	14985	0,1458238
94	12C	103702	31182	0,30068851
95	12B	88957	82574	0,92824623
96	12A	102585	91105	0,8880928

Platte E					AGcont03	Platte F				
		wt	del	ratio dmt/mt				wt	del	ratio dmt/mt
1	1H	99378		0		1	1H	84058		0
2	1G	100988		0		2	1G	91296		0
3	1F	105927	30660	0,28944462		3	1F	87892		0
4	1E	114058		0		4	1E	80133		0
5	1D	107697	37879	0,35171825		5	1D	78716		0
6	1C	94939	36590	0,38540537		6	1C	98786	24283	0,24581418
7	1B	105841	28107	0,26555872		7	1B	67472		0
8	1A	102569		0		8	1A	80577		0
9	2H	108166		0		9	2H	87281		0
10	2G	100785		0		10	2G	83865		0
11	2F	108660		0		11	2F	85221		0
12	2E	109175		0		12	2E	56507	14728	0,26064027
13	2D	90637		0		13	2D	76537		0
14	2C	99880	44337	0,44390268		14	2C	84157		0
15	2B	105218	75719	0,71963923		15	2B	88946	29900	0,33615902
16	2A	106200	50077	0,47153484		16	2A	74814	7355	0,09831048
17	3H	93837	16363	0,17437684		17	3H	92158		0
18	3G	96404		0		18	3G	94381	26770	0,2836376
19	3F	91285	36596	0,40089829		19	3F	85369	27123	0,31771486
20	3E	118107		0		20	3E	67532	15070	0,22315347
21	3D	KONTROLLE				21	3D	KONTROLLE		
22	3C	KONTROLLE				22	3C	KONTROLLE		
23	3B	93699	49480	0,52807394		23	3B	82092		0
24	3A	90765	22685	0,24993114		24	3A	89063		0
25	4H	123502	103582	0,83870707		25	4H	79186	18478	0,23334933
26	4G	67547		0		26	4G	92978		0
27	4F	82077		0		27	4F	52906		0
28	4E	78881	114949	1,45724572		28	4E	43880		0
29	4D	100502	109938	1,09388868		29	4D	58240		0
30	4C	69006		0		30	4C	10449		0
31	4B	71650	96968	1,35335659		31	4B	86389		0
32	4A					32	4A	50786		0
33	5H	110631	48227	0,43592664		33	5H	40123		0
34	5G	128042		0		34	5G	82171		0
35	5F	78468	66264	0,84447163		35	5F	45108		0
36	5E	83765	44517	0,53145108		36	5E	70887	19187	0,27067022
37	5D	98396		0		37	5D	50984		0
38	5C	59170		0		38	5C	42386		0
39	5B	82802	33987	0,4104611		39	5B	38618		0
40	5A					40	5A	31922		0
41	6H	110716		0		41	6H	64359		0
42	6G	117942		0		42	6G	36462		0
43	6F	91365	59742	0,65388278		43	6F	65732		0
44	6E	85424	33994	0,39794437		44	6E	12021	7989	0,66458697
45	6D	89119	40346	0,45272052		45	6D	45877		0
46	6C	67307	47946	0,7123479		46	6C	34308		0
47	6B	115623	99550	0,86098787		47	6B	36363		0
48	6A	105938		0		48	6A	48513		0
49	7H	48627		0		49	7H	99105	12666	0,12780384
50	7G	61814		0		50	7G	53192		0

Anhang

51	7F	107779		0
52	7E	88310	7575	0,08577738
53	7D	50181	9587	0,1910484
54	7C	36205		0
55	7B	45062		0
56	7A	52279		0
57	8H	46541		0
58	8G	49341		0
59	8F	74006		0
60	8E	49579		0
61	8D	36432	12271	0,33681928
62	8C	54692		0
63	8B	29186		0
64	8A	69440		0
65	9H	62074	6788	0,10935335
66	9G	98346		0
67	9F	97695		0
68	9E	80862		0
69	9D	64768		0
70	9C	84006		0
71	9B	94502	7949	0,08411462
72	9A	47321	7392	0,15620972
73	10H	25513		0
74	10G	88209		0
75	10F	106083		0
76	10E	61663	102809	1,66727211
77	10D	KONTROLLE		
78	10C	79236		0
79	10B	69427		0
80	10A	52987	25709	0,48519448
81	11H	80179	46781	0,58345701
82	11G	50323	12949	0,25731773
83	11F	77261	45100	0,58373565
84	11E	55285		0
85	11D	75307	48754	0,6474033
86	11C	33451		0
87	11B	46531		0
88	11A	57035		0
89	12H	KONTROLLE		
90	12G	86060		0
91	12F	46127		0
92	12E	40103		0
93	12D	34695		0
94	12C	86632	49972	0,57683073
95	12B	53207	14825	0,27862875
96	12A	39117		0

51	7F	80036	12946	0,16175221
52	7E	43448		0
53	7D	26781		0
54	7C	27810		0
55	7B	55209		0
56	7A	41642		0
57	8H	84767	20425	0,24095462
58	8G	52239		0
59	8F	41965		0
60	8E	73498		0
61	8D	40842		0
62	8C	45056		0
63	8B	42585		0
64	8A	45605		0
65	9H	66443	10289	0,15485454
66	9G	52375		0
67	9F	47008	6224	0,132403
68	9E	43307		0
69	9D	15792		0
70	9C	43007		0
71	9B	40756	10425	0,25579056
72	9A	45134		0
73	10H	113413	46776	0,41243949
74	10G	94824		0
75	10F	112338		0
76	10E	113582	9478	0,08344632
77	10D	KONTROLLE		
78	10C	108026		0
79	10B	58243	16692	0,28659238
80	10A	106381	25319	0,23800303
81	11H	102439	13026	0,1271586
82	11G	106200		0
83	11F	107392	19610	0,18260206
84	11E	105142	21774	0,20709136
85	11D	100623		0
86	11C	102292	18951	0,18526375
87	11B	84993		0
88	11A	99324	21862	0,22010793
89	12H	KONTROLLE		
90	12G	98293	11950	0,12157529
91	12F	106335	18902	0,17775897
92	12E	122387	10076	0,08232901
93	12D	107972		0
94	12C	108290		0
95	12B	110044		0
96	12A	115796		0

Rohdaten der Gruppe PA

Platte A					AG-100	Platte B				
		wt	del	ratio dmt/mt				wt	del	ratio dmt/mt
1	1H	133460	15516	0,11625955		1	1H	112940		0
2	1G	144338		0		2	1G	125822	42908	0,34102144
3	1F	139393	15861	0,1137862		3	1F	113363		0
4	1E	141329	36359	0,25726496		4	1E	67951		0
5	1D	140945		0		5	1D	58981		0
6	1C	147903		0		6	1C	95092	28666	0,30145543
7	1B	140727		0		7	1B	97186		0
8	1A	144321	22958	0,15907595		8	1A	75624		0
9	2H	133918		0		9	2H	104328		0
10	2G	0				10	2G	90886		0
11	2F	113398	16556	0,14599905		11	2F	121845		0
12	2E	141810	12033	0,08485297		12	2E	104218		0
13	2D	143008		0		13	2D	113190	12864	0,11364962
14	2C	150260		0		14	2C	115284		0
15	2B	145387		0		15	2B	116351		0
16	2A	147607	41865	0,28362476		16	2A	113307		0
17	3H	154609	50674	0,32775582		17	3H	124277	30837	0,24813119
18	3G	145316	77955	0,5364516		18	3G	29507		0
19	3F	144131	76742	0,53244618		19	3F	118780		0
20	3E	142797		0		20	3E	45005		0
21	3D	KONTROLLE				21	3D	KONTROLLE		
22	3C	KONTROLLE				22	3C	KONTROLLE		
23	3B	148137	31229	0,21081161		23	3B	98093		0
24	3A	140426	58426	0,41606255		24	3A	119650		0
25	4H	93790		0		25	4H	82244		0
26	4G	49357		0		26	4G	101788		0
27	4F	91140		0		27	4F	118784		0
28	4E	112758		0		28	4E	128771		0
29	4D	112697		0		29	4D	97939		0
30	4C	117993		0		30	4C	122086		0
31	4B	125361		0		31	4B	121198		0
32	4A	121067		0		32	4A	119460	30280	0,25347397
33	5H	89796		0		33	5H	124918	10185	0,08153349
34	5G	112232		0		34	5G	112074		0
35	5F	87133		0		35	5F	116607		0
36	5E	126249		0		36	5E	123152		0
37	5D	110270		0		37	5D	91339		0
38	5C	120059		0		38	5C	104069		0
39	5B	110653		0		39	5B	70651		0
40	5A	108586		0		40	5A	109781		0
41	6H	127168		0		41	6H	114950		0
42	6G	126169	14203	0,11257123		42	6G	116210		0
43	6F	40175		0		43	6F	47749		0
44	6E	118141		0		44	6E	82592		0
45	6D	112154		0		45	6D	87984		0
46	6C	121263		0		46	6C	112999		0
47	6B	129910		0		47	6B	118130		0

48	6A	136144		0
49	7H	90662		0
50	7G	88563		0
51	7F	92343	11892	0,12878074
52	7E	93733		0
53	7D	91685	6843	0,07463598
54	7C	96004		0
55	7B	92508		0
56	7A	97291		0
57	8H	95889		0
58	8G	97547		0
59	8F	84172		0
60	8E	92331	8637	0,09354388
61	8D	100847		0
62	8C	91595		0
63	8B	89823		0
64	8A	83002		0
65	9H	89464		0
66	9G	87256	9441	0,10819886
67	9F	87474		0
68	9E	83619		0
69	9D	89137		0
70	9C	96266	2256	0,02343507
71	9B	87778	23276	0,26516895
72	9A	96436	3618	0,03751711
73	10H	92433		0
74	10G	87961	6074	0,06905333
75	10F	90677		0
76	10E	85470		0
77	10D	KONTROLLE		
78	10C	77722		0
79	10B	83801		0
80	10A	79780		0
81	11H	75257		0
82	11G	82907		0
83	11F	82916		0
84	11E	74681		0
85	11D	75220		0
86	11C	78366		0
87	11B	80444		0
88	11A	71350	22503	0,31538893
89	12H	KONTROLLE		
90	12G	74377		0
91	12F	91636		0
92	12E	73201		0
93	12D	80600		0
94	12C	71898		0
95	12B	71557		0
96	12A	84662	9024	0,10658855

48	6A	122003		0
49	7H	72230	4369	0,06048733
50	7G	82481	6031	0,07311987
51	7F	84604		0
52	7E	100885	9332	0,09250136
53	7D	94652		0
54	7C	92407		0
55	7B	88931	6131	0,06894109
56	7A	78591		0
57	8H	72035	7374	0,10236669
58	8G	93150		0
59	8F	88821		0
60	8E	83973		0
61	8D	87587	18676	0,21322799
62	8C	85206		0
63	8B	72642		0
64	8A	69759		0
65	9H	86863		0
66	9G	93712		0
67	9F	80525		0
68	9E	93104	17442	0,18733889
69	9D	47367		0
70	9C	97469	54034	0,55437113
71	9B	108024		0
72	9A	86342	23233	0,2690811
73	10H	57687		0
74	10G	50646	12548	0,24775895
75	10F	61012		0
76	10E	67436	15470	0,22940269
77	10D	KONTROLLE		
78	10C	62709	16466	0,26257794
79	10B	58911		0
80	10A	72229		0
81	11H	59718		0
82	11G	56748	12970	0,22855431
83	11F	13934	5083	0,36479116
84	11E	34719	8903	0,2564302
85	11D	35172	10580	0,30080746
86	11C	27593	6944	0,25165803
87	11B	24381	11000	0,45117099
88	11A	74143	14513	0,19574336
89	12H	KONTROLLE		
90	12G	62220	9013	0,14485696
91	12F	27832	4498	0,16161253
92	12E	94129	4691	0,04983586
93	12D	45776	3104	0,06780846
94	12C	69569	8471	0,121764
95	12B	52265	10096	0,19316943
96	12A	69127	12607	0,18237447

Platte C					AG 01	Platte D				
		wt	del	ratio dmt/mt				wt	del	ratio dmt/mt
1	1H	123266	13248	0,10747489		1	1H	105928	20252	0,19118647
2	1G	102039	14039	0,13758465		2	1G	92106		0
3	1F	95512		0		3	1F	114688	35009	0,30525426
4	1E	130528		0		4	1E	113932		0
5	1D	127038	14837	0,11679183		5	1D	112226		0
6	1C	129235	16750	0,12960885		6	1C	117480		0
7	1B	132104	16832	0,12741476		7	1B	121813	34045	0,27948577
8	1A	134613	20519	0,15242956		8	1A	118542	28573	0,24103693
9	2H	124025	12193	0,09831082		9	2H	115127	65561	0,56946676
10	2G	103138		0		10	2G	105387		0
11	2F	130587	19791	0,15155414		11	2F	115742		0
12	2E	125366		0		12	2E	114721	48440	0,42224179
13	2D	125846		0		13	2D	108302	25727	0,23754871
14	2C	128961	15517	0,1203232		14	2C	105456		0
15	2B	132634	24427	0,18416846		15	2B	110106		0
16	2A	133399		0		16	2A	113121		0
17	3H	131059	6803	0,05190792		17	3H	75052	17143	0,22841497
18	3G	135939		0		18	3G	110842		0
19	3F	129799	27775	0,2139847		19	3F	117078	15709	0,13417551
20	3E	133485		0		20	3E	116488	41051	0,3524054
21	3D	KONTROLLE				21	3D	KONTROLLE		
22	3C	KONTROLLE				22	3C	KONTROLLE		
23	3B	134987	13867	0,10272841		23	3B	99816		0
24	3A	131584		0		24	3A	100202	18567	0,1852957
25	4H					25	4H	121819	27170	0,22303582
26	4G	106801		0		26	4G	117121		0
27	4F	93943	10209	0,10867228		27	4F	113545		0
28	4E	103485	64515	0,62342368		28	4E	113000		0
29	4D	100467	24568	0,24453801		29	4D	111767		0
30	4C	103116		0		30	4C	92185		0
31	4B	98567		0		31	4B	101661		0
32	4A					32	4A	106790	62057	0,58111246
33	5H					33	5H	116116		0
34	5G	73089		0		34	5G	109385		0
35	5F	50460		0		35	5F	115394		0
36	5E	17097		0		36	5E	114189	21675	0,18981688
37	5D	14437		0		37	5D	102753		0
38	5C					38	5C	109261		0
39	5B					39	5B	114626		0
40	5A					40	5A	111665	8763	0,0784758
41	6H					41	6H			
42	6G	40736		0		42	6G	88991		0
43	6F	2005		0		43	6F	115848		0
44	6E	7499		0		44	6E	116140		0
45	6D					45	6D	94094		0
46	6C	79657		0		46	6C	113304	22502	0,19859846
47	6B	35924		0		47	6B	109955		0
48	6A	82650		0		48	6A	127043	26175	0,2060326
49	7H	106006		0		49	7H	50058	3428	0,06848056

50	7G	100001		0
51	7F	97661	7576	0,07757447
52	7E	96141	11416	0,11874226
53	7D			
54	7C	110864		0
55	7B	95148		0
56	7A	112531	3750	0,03332415
57	8H	103525		0
58	8G	99646	20387	0,20459426
59	8F	100722		0
60	8E	106692		0
61	8D	101794		0
62	8C	8106		0
63	8B	105447	14136	0,13405787
64	8A	103202		0
65	9H	103864		0
66	9G	103327	4994	0,04833199
67	9F	94127		0
68	9E	96561		0
69	9D	92134	12161	0,13199253
70	9C	95966		0
71	9B	96574		0
72	9A	94623	38140	0,40307325
73	10H	42050		0
74	10G	34296		0
75	10F	33786		0
76	10E	40378		0
77	10D	KONTROLLE		
78	10C			
79	10B	41552		0
80	10A	43181		0
81	11H	42952		0
82	11G	39155		0
83	11F	38574		0
84	11E	39566		0
85	11D	45357		0
86	11C	47469		0
87	11B	49681		0
88	11A	52520		0
89	12H	KONTROLLE		
90	12G	47908		0
91	12F	47943		0
92	12E	51516		0
93	12D	51150		0
94	12C	49729		0
95	12B	47135		0
96	12A	47054		0

50	7G	94123	11616	0,12341298
51	7F	78350	6607	0,08432674
52	7E	93379	24715	0,26467407
53	7D	90669		0
54	7C	105836	13557	0,12809441
55	7B	40209	3916	0,09739113
56	7A	90282	7955	0,0881128
57	8H	90568		0
58	8G	79349	14967	0,18862241
59	8F	78460		0
60	8E	78885	8045	0,1019839
61	8D	76763		0
62	8C	61537		0
63	8B	83855	6139	0,07320971
64	8A	81703	29240	0,3578816
65	9H	53210		0
66	9G	88711	38970	0,43929163
67	9F	77589	4367	0,05628375
68	9E	33043		0
69	9D	68837	13472	0,1957087
70	9C	58097		0
71	9B	60273	11222	0,18618619
72	9A	83094		0
73	10H	94504	21519	0,22770465
74	10G	70802	4914	0,06940482
75	10F			
76	10E	74503		0
77	10D	KONTROLLE		
78	10C			
79	10B	103520		0
80	10A	86622		0
81	11H	69968		0
82	11G	41165		0
83	11F	71729		0
84	11E	44464		0
85	11D	54832		0
86	11C	66649		0
87	11B	46543	3831	0,08231098
88	11A	67776		0
89	12H	KONTROLLE		
90	12G	57488		0
91	12F	52124	5782	0,11092779
92	12E	70337		0
93	12D	66942	4940	0,07379523
94	12C	74017	8762	0,11837821
95	12B	62114	5713	0,09197604
96	12A	55858	5925	0,10607254

Platte E					AG 03	Platte F				
		wt	del	ratio dmt/mt				wt	del	ratio dmt/mt
1	1H	135303	46926	0,34682158		1	1H	114150	52774	0,46232151
2	1G	126009	12251	0,09722321		2	1G	90341	18438	0,20409338
3	1F	127902	16930	0,13236697		3	1F	107257		0
4	1E	125966	25895	0,20557134		4	1E	114776	119906	1,04469576
5	1D	133508	15819	0,11848728		5	1D	77088		0
6	1C	117598	18190	0,1546795		6	1C	104181		0
7	1B	101202		0		7	1B	105441	46208	0,4382356
8	1A	125099	31132	0,2488589		8	1A	99087	22913	0,23124123
9	2H	139121	9986	0,07177924		9	2H	107384		0
10	2G	123971	29326	0,23655532		10	2G	110807		0
11	2F	123597	24236	0,1960889		11	2F	98203		0
12	2E	122143	19807	0,16216238		12	2E	76864	8459	0,11005152
13	2D	111815	33607	0,30055896		13	2D	105514		0
14	2C	124296		0		14	2C	103988		0
15	2B	126025	17961	0,14251934		15	2B	94870		0
16	2A	123141	25793	0,20945908		16	2A	119558	40539	0,33907392
17	3H					17	3H	133925	23706	0,17700952
18	3G	121927		0		18	3G	10858		0
19	3F	115377	26986	0,2338941		19	3F	112894	54881	0,48612858
20	3E	127872	26113	0,20421202		20	3E	111251		0
21	3D	KONTROLLE				21	3D	KONTROLLE		
22	3C	KONTROLLE				22	3C	KONTROLLE		
23	3B	128573	30313	0,2357649		23	3B	111400	39019	0,35026032
24	3A	118412		0		24	3A	114052		0
25	4H					25	4H	71583	8683	0,12129975
26	4G	72920		0		26	4G	70691		0
27	4F	7832		0		27	4F	83726	7497	0,08954208
28	4E					28	4E	94226	12008	0,12743829
29	4D					29	4D	84250		0
30	4C	33735		0		30	4C	78270	11773	0,15041523
31	4B	18297		0		31	4B	75842		0
32	4A					32	4A	97301		0
33	5H	8668		0		33	5H	78486	10434	0,13294091
34	5G	42200		0		34	5G	85303		0
35	5F	21366		0		35	5F	84552		0
36	5E	17118		0		36	5E	78958	5878	0,07444464
37	5D	26436		0		37	5D	80664		0
38	5C	5070		0		38	5C	80299	13689	0,17047535
39	5B	7917		0		39	5B	65172		0
40	5A	38974		0		40	5A	80284	11604	0,14453689
41	6H					41	6H			
42	6G	25925		0		42	6G	82572		0
43	6F					43	6F	74425		0
44	6E					44	6E	66920		0
45	6D					45	6D	85579		0
46	6C					46	6C	71934		0
47	6B					47	6B	77522		0
48	6A					48	6A	104182	11289	0,10835845
49	7H	78360	20855	0,26614344		49	7H			
50	7G	78224		0		50	7G	91812		0

51	7F	79070		0
52	7E	80014		0
53	7D	81415		0
54	7C	80335		0
55	7B	78304		0
56	7A	78488		0
57	8H	80425		0
58	8G	79934		0
59	8F	79897	27647	0,34603302
60	8E	74588		0
61	8D	74853	8620	0,11515905
62	8C	72579	15790	0,21755604
63	8B	87719		0
64	8A	71909	7575	0,10534147
65	9H	74769		0
66	9G	73115		0
67	9F	71283		0
68	9E	68625		0
69	9D	76788		0
70	9C	70172		0
71	9B	71127		0
72	9A	68639	8921	0,12996984
73	10H	56238		0
74	10G	48647		0
75	10F	29248		0
76	10E	50852		0
77	10D	KONTROLLE		
78	10C			
79	10B	50847		0
80	10A	23521		0
81	11H	49155		0
82	11G	45860		0
83	11F	45332		0
84	11E	47461		0
85	11D	46714		0
86	11C	47083		0
87	11B	45747		0
88	11A	44402		0
89	12H	KONTROLLE		
90	12G	32319		0
91	12F	36676		0
92	12E	34027		0
93	12D	33248		0
94	12C	39010		0
95	12B	38789		0
96	12A	40090		0

51	7F	99417		0
52	7E	93480		0
53	7D	86987	28096	0,32299079
54	7C	89347		0
55	7B	74526	17653	0,23687035
56	7A	92928	37544	0,40401171
57	8H	69888	12364	0,17691163
58	8G	97363		0
59	8F	96952	46884	0,4835795
60	8E	89804	15021	0,16726426
61	8D	84132	10025	0,11915799
62	8C	72683	11798	0,16232131
63	8B	80927		0
64	8A	85522	6274	0,07336124
65	9H	71486		0
66	9G	82759	18967	0,22918353
67	9F	86774	16716	0,19263835
68	9E	85852	16912	0,19699017
69	9D	48048		0
70	9C	90444		0
71	9B	87494		0
72	9A	75337	24525	0,32553725
73	10H	96086	19617	0,20416086
74	10G	81464	10652	0,13075714
75	10F	93102		0
76	10E	50634	17999	0,35547261
77	10D	KONTROLLE		
78	10C			
79	10B	88870	11144	0,12539665
80	10A	95653	27646	0,28902387
81	11H	33416	4448	0,13310989
82	11G	96517	8404	0,08707274
83	11F	101527	20388	0,20081358
84	11E	96929	17848	0,18413478
85	11D	117441		0
86	11C	95505	20304	0,2125962
87	11B	84078	18590	0,22110421
88	11A	94611	19896	0,21029267
89	12H	KONTROLLE		
90	12G	91187	8709	0,09550703
91	12F	48557	5084	0,10470169
92	12E	96842	20973	0,21656926
93	12D	59349		0
94	12C	70891		0
95	12B	89526		0
96	12A	95987	18581	0,1935783

7 Literatur

- **ABI Prism® 310** (1997) *Genetic Analyzer User's Manual*. Applied Biosystems.
- **Alberts B**, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994). *Molecular biology of the cell*. 3.Auflage, Garland, New York; London
- **Anderson S**, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature 290(5806): 457-65.
- **Berg, J M.**, Tymoczko J. L, Streyer L (2003) *Biochemie*. 5. Auflage, Heidelberg [u.a.], Spektrum Akademischer Verlag
- **Berneburg M**, Gattermann N, Stege H, Grewe M, Vogelsang K, Ruzicka T, Krutmann J (1997) *Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system*. Photochem Photobiol 66(2): 271-5.
- **Berneburg M**, Plettenberg H, Medve-König K, Pfahlberg A, Gers-Barlag H, Gefeller O, Krutmann J (2004) *Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin*. J Invest Dermatol 122(5): 1277-83.
- **Biagini G**, Pallotti F, Carraro S, Sgarbi G, Pich MM, Lenaz G, Anzivino F, Gualandi G, Xin D (1998) *Mitochondrial DNA in platelets from aged subjects*. Mech Ageing Dev 101(3): 269-75.
- **Birch-Machin MA**, Tindall M, Turner R, Haldane F, Rees JL (1998) *Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging*. J Invest Dermatol 110(2): 149-52.
- **Botto N**, Berti S, Manfredi S, Al-Jabri A, Federici C, Clerico A, Ciofini E, Biagini A, Andreassi MG (2005) *Detection of mtDNA with 4977 bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease*. Mutat Res 570(1): 81-8.
- **Bua E**, Johnson J, Herbst A, Delong B, McKenzie D, Salamat S, Aiken JM (2006) *Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers*. Am J Hum Genet. 79(3):469-80.
- **Casula M**, Weverling GJ, Wit FW, Timmermans EC, Stek M Jr, Lange JM, Reiss P (2005). *Mitochondrial DNA and RNA increase in peripheral blood mononuclear cells from HIV-1-infected patients randomized to receive Stavudine-containing or Stavudin-sparing combination therapy*. JID 192: 1794-1800.

- **Christensen K**, Johnson TE, Vaupel JW (2006). *The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights*. Nat Rev Genet 7(6): 436-48.
- **Cortopassi GA**, Arnheim N (1990) *Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans*. Nucleic Acids Res 18(23): 6927-33.
- **Cortopassi GA**, Shibata D, Soong NW, Arnheim N (1992) *A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A 89(16): 7370-4.
- **Cottrell DA**, Blakely EL, Johnson MA, Borthwick GM, Ince PI, Turnbull DM (2001) *Mitochondrial DNA mutations in disease and ageing*. Novartis Found Symp. 235:234-43; discussion 243-6.
- **De Benedictis G**, Rose G, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Passarino G, Bonafe M, Monti D, Baggio G, Bertolini S, Mari D, Mattace R, Franceschi C (1999) *Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans*. FASEB J 13(12): 1532-6.
- **Drouet M**, Lauthier F, Charmes JP, Sauvage P, Ratinaud MH (1999) *Age-associated changes in mitochondrial parameters on peripheral human lymphocytes*. Exp Gerontol 34(7): 843-52.
- **Gadaleta MN**, Cormio A, Pesce V, Lezza AM, Cantatore P (1998) *Aging and mitochondria*. Biochimie 80(10): 863-70.
- **Gattermann N**, Berneburg M, Heinisch J, Aul C, Schneider W (1995) *Detection of the ageing-associated 5-Kb common deletion of mitochondrial DNA in blood and bone marrow of hematologically normal adults. Absence of the deletion in clonal bone marrow disorders*. Leukemia 9(10): 1704-10.
- **Harman D** (1956) *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol 11(3): 298-300.
- **Harman D** (1992) *Free radical theory of aging*. Mutat Res 275(3-6): 257-66.
- **Herbst A**, Pak JW, McKenzie D, Bua E, Bassiouni M, Aiken JM (2007) *Accumulation of mitochondrial DNA deletion mutations in aged muscle fibers: evidence for a causal role in muscle fiber loss*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 62(3):235-45.
- **Hsieh RH**, Hou JH, Hsu HS, Wei YH (1994) *Age-dependent respiratory function decline and DNA deletions in human muscle mitochondria*. Biochem Mol Biol Int 32(6): 1009-22.

-
- **Iwai K**, Iwamura Y, Yamashita S, Wadano Y, Mesaki N (2006). *Effect of tea catechins on mitochondrial DNA 4977-bp deletions in human leucocytes*. Mutat Res 595 (1-2): 191-195.
 - **Jelkmann IM**, (2008). *Mutagenese mitochondrialer DNA in Blutzellen in Abhängigkeit von inneren und äußeren Einflüssen*, Med. Diss., Kiel
 - **Kato T**, Winokur G, McMahon FJ, DePaulo JR, Crowe RR (1997) *Quantitative analysis of leukocyte mitochondrial DNA deletion in affective disorders*. Biol Psychiatry 42(5): 311-6.
 - **Kujoth GC**, Leeuwenburgh C, Prolla TA (2006) *Mitochondrial DNA mutations and apoptosis in mammalian aging*. Cancer Res 66(15): 7386-9.
 - **Lee HC**, Pang CY, Hsu HS, Wei YH (1994) *Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing*. Biochim Biophys Acta 1226(1): 37-43.
 - **Lee HC**, Wei YH (2000) *Mitochondrial role in life and death of the cell*. J. Biomed. Sci. 7, 2–15.
 - **Lee HC**, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH (2000) *Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells*. Biochem J 348 Pt 2: 425-32.
 - **Lenaz G**, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML, Giuliano G, Merlo Pich M, Paolucci U, Parenti Castelli G, Ventura B (2002) *Role of mitochondria in oxidative stress and aging*. Ann N Y Acad Sci 959: 199-213.
 - **Li CT**, Li L, Liu Y (2006) *Relationship between human age and mtDNA 4977 deletions in human blood cells*. Fa Yi Xue Za Zhi 22(5): 346-8.
 - **Linnane AW**, Zhang C, Baumer A, Nagley P (1992) *Mitochondrial DNA mutation and the ageing process: bioenergy and pharmacological intervention*. Mutat Res 275(3-6): 195-208.
 - **Löffler G**, Petrides PE (2003) *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage, Heidelberg [u.a.], Springer-Verlag
 - **Meissner C**, Mohamed SA, Klueter H, Hamann K, von Wurmb N, Oehmichen M (2000) *Quantification of mitochondrial DNA in human blood cells using an automated detection system*. Forensic Sci Int 113(1-3): 109-12.
 - **Meissner C**, von Wurmb N, Schimansky B, Oehmichen M (1999) *Estimation of age at death based on quantitation of the 4977-bp deletion of human mitochondrial DNA in skeletal muscle*. Forensic Sci Int 105(2): 115-24.
 - **Mita S**, Rizzuto R, Moraes CT, Shanske S, Arnaudo E, Fabrizi GM, Koga Y, DiMauro S, Schon EA (1990) *Recombination via flanking direct repeats is a*

major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. Nucleic Acids Res 18(3): 561-7.

- **Mohamed SA**, Wesch D, Blumenthal A, Bruse P, Windler K, Ernst M, Kabelitz D, Oehmichen M, Meissner C (2004) *Detection of the 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in different human blood cells.* Exp Gerontol 39(2): 181-8.
- **Müller-Höcker J** (1994) *Molecular pathology of mitochondrial disorders.* Verh Dtsch Ges Pathol 78: 48-93.
- **Nebel A**, Croucher PJ, Stiegeler R, Nikolaus S, Krawczak M, Schreiber S (2005) *No association between microsomal triglyceride transfer protein (MTP) haplotype and longevity in humans.* Proc Natl Acad Sci USA. 102, 7906-7909.
- **Niemi AK**, Moilanen JS, Tanaka M, Hervonen A, Hurme M, Lehtimäki T, Arai Y, Hirose N, Majamaa K (2005) *A combination of three common inherited mitochondrial DNA polymorphisms promotes longevity in Finnish and Japanese subjects.* Eur J Hum Genet 13(2): 166-70.
- **Ozawa T** (1995) *Mitochondrial DNA mutations associated with aging and degenerative diseases.* Exp Gerontol 30(3-4): 269-90.
- **Papa S** (1996) *Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications.* Biochim Biophys Acta 1276(2): 87-105.
- **Parry H**, Cohen S, Schlarb JE, Tyrrell DA, Fisher A, Russell MA, Jarvis MJ (1997) *Smoking, alcohol consumption, and leukocyte counts.* Am J Clin Pathol 107(1): 64-7.
- **Partridge MA**, Huang SX, Kibriya MG, Ahsan H, Davidson MM, Hei TK (2009) *Environmental mutagens induced transversions but not transitions in regulatory region of mitochondrial DNA.* J Toxicol Environ Health A. 2009;72(5):301-4.
- **Pawelec G**, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fülöp T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E, Solana R (2002) *T cells and aging, January 2002 update.* Front Biosci 7: d1056-183.
- **Pikó L**, Meyer R, Eipe J, Costea N (1978) *Structural and replicative forms of mitochondrial DNA from human leukocytes in relation to age.* Mech Ageing Dev 7(5):351-65.
- **Reichmann H**, Janetzky B, Seibel P (1996) *Das mitochondriale Genom- die kleine Schwester des nukleären Genoms.* Sandorama 3, 13-18.
- **Reiter RJ** (1995) *Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain.* Faseb J 9(7): 526-33.

-
- **Santoro A**, Salvioli S, Raule N, Capri M, Sevini F, Valensin S, Monti D, Bellizzi D, Passarino G, Rose G, De Benedictis G, Franceschi C (2006) *Mitochondrial DNA involvement in human longevity*. *Biochim Biophys Acta* 1757(9-10): 1388-99.
 - **Schmid F** (1990) *Mitochondrien*. *Biologische Medizin* 3: 144-51.
 - **Schmidt RF**, Thews G, Lang F (2000) *Physiologie des Menschen*. 28. korrigierte Auflage, Springer, Berlin [u.a.]
 - **Schon EA**, Bonilla E, DiMauro S (1997) *Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis*. *J Bioenerg Biomembr* 29(2): 131-49.
 - **Schwartz J**, Weiss ST (1994) *Cigarette smoking and peripheral blood leukocyte differentials*. *Ann Epidemiol* 4(3): 236-42.
 - **Shieh DB**, Chen CC, Shih TS, Tai HM, Wei YH, Chang HY (2007) *Mitochondrial DNA alterations in blood of the humans exposed to N,N-dimethylformamide*. *Chem Biol Interact* 20;165(3):211-9.
 - **Taanman JW**, (1999) *The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication*. *Biochim Biophys Acta* 1410(2): 103-23.
 - **Tan D**, Goerlitz DS, Dumitrescu RG, Han D, Seillier-Moiseiwitsch F, Spornak SM, Orden RA, Chen J, Goldman R, Shields PG. (2008) *Associations between cigarette smoking and mitochondrial DNA abnormalities in buccal cells*. *Carcinogenesis*.; 29(6):1170-7.
 - **Trifunovic A**, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlöf S, Oldfors A, Wibom R, Törnell J, Jacobs HT, Larsson NG (2004) *Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase*. *Nature* 429(6990): 417-23.
 - **Varanasi SS**, Datta HK (2001) *Southern analysis of mitochondrial DNA in cortical bone of elderly patients undergoing knee and hip arthroplasty*. *J Pathol* 193(4): 557-62.
 - **von Wurmb N**, Oehmichen M, Meissner C (1998) *Demonstration of the 4977 bp deletion in human mitochondrial DNA from intravital and postmortem blood*. *Mutat Res* 422(2): 247-54.
 - **von Wurmb-Schwark N**, Higuchi R, Fenech AP, Elfstroem C, Meissner C, Oehmichen M, Cortopassi GA (2002) *Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR*. *Forensic Sci Int*. 126(1):34-9.
 - **von Wurmb-Schwark N**, Ringleb A, Schwark T, Broese T, Weirich S, Schlaefke D, Wegener R, Oehmichen M (2007) *The effect of chronic alcohol*

consumption on mitochondrial DNA mutagenesis in human blood. Mutat Res 1;637(1-2):73-9.

- **Wei YH** (1998) *Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. Proc Soc Exp Biol Med 217(1): 53-63.*
- **Zhang J**, Asin-Cayuela J, Fish J, Michikawa Y, Bonafe M, Olivieri F, Passarino G, De Benedictis G, Franceschi C, Attardi G (2003) *Strikingly higher frequency in centenarians and twins of mtDNA mutation causing remodeling of replication origin in leukocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 100(3): 1116-21.*

Internetquellen:

- http://www.georgetown.edu/faculty/ballc/webtools/web_chi.html
- <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>

8 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Nicole von Wurmb-Schwark und Dr. med. Thorsten Schwark für die Bereitstellung des Themas, die ständige Unterstützung sowie die kritische Korrektur meiner Dissertation.

Für den Arbeitsplatz am Institut für Rechtsmedizin der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und die dort vorgefundenen guten Arbeitsbedingungen danke ich dem Direktor, Prof. Dr. med. Dr. jur. Hans-Jürgen Kaatsch.

Ich bedanke mich des Weiteren bei den Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin. Insbesondere möchte ich mich bei Anke Heinrich für die Hilfe im Labor, sowie den medizinisch technischen Assistentinnen Christel Bachmann, Ingrid Wessel und Marion Matthiesen bedanken, die mich im Labor unterstützten.

Ich danke Prof. Dr. med. Stefan Schreiber, Direktor des Instituts für Molekularbiologie des UKSH und seiner Arbeitsgruppe für die freundliche Überlassung eines Großteils meines Arbeitsmaterials. Insbesondere danke ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Almut Nebel für die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für die liebevolle und verständnisvolle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Drenske
Vorname:	Carolin
Geburtstag:	22. Oktober 1981
Geburtsort:	Pinneberg
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulausbildung

1987-1997:	Waldorfschule Elmshorn
1997-1999:	Realschule Horst
1999-2000:	Internatsgymnasium Schloß Plön
2000-2002:	Bismarck-Gymnasium Elmshorn

Universitätsausbildung

2002- 2004:	Vorklinisches Studium der Humanmedizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2004:	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
2004- 2008	Klinisches Studium der Humanmedizin, Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2007/2008:	Praktisches Jahr
11/2008:	Ärztliche Prüfung (Staatsexamen)
11/2008:	Approbation als Ärztin
Seit 05/2005:	Dissertation am Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel